

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O ESFREGAÇO SANGUÍNEO E DE
BUFFY-COAT NO DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITAS**

Andreia Filipa Basto Silva

Orientador:

Professor Doutor Ricardo Jorge Pereira Córdova Marcos

Co-orientadores:

Professora Doutora Marta Susana Amaro dos Santos

Doutora Sónia Vanessa Campos Silva Pacheco

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O ESFREGAÇO SANGUÍNEO E DE
BUFFY-COAT NO DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITAS**

Andreia Filipa Basto Silva

Orientador:

Professor Doutor Ricardo Jorge Pereira Córdova Marcos

Co-orientadores:

Professora Doutora Marta Susana Amaro dos Santos

Doutora Sónia Vanessa Campos Silva Pacheco

RESUMO

Os hemoparasitas, nos últimos anos, têm sido um problema de importância crescente devido ao aumento da sua prevalência e distribuição. Deste modo, torna-se fundamental o seu diagnóstico e compreender que métodos são mais vantajosos. No estudo realizado comparou-se dois métodos de diagnóstico distintos, o esfregaço sanguíneo e de *buffy-coat*, no diagnóstico de hemoparasitas, com o intuito de testar a sensibilidade do esfregaço de *buffy-coat*. Assim, foram avaliados 100 animais de companhia suspeitos de estarem infetados por hemoparasitas, para se tentar detetar, quantificar e comparar a morfologia dos organismos encontrados por ambos os métodos. Em cada animal realizou-se um esfregaço sanguíneo e um esfregaço de *buffy-coat*, onde se pesquisou a presença de hemoparasitas. Nos animais positivos fez-se uma contagem do número de organismos presentes e foi possível avaliar a morfologia destes por ambos os métodos. Dos 100 animais avaliados, 14 tinham *Babesia* e 4 tinham microfilárias, tendo sido possível o seu diagnóstico através de ambos os métodos. Relativamente à contagem de microfilárias, 3 dos 4 casos apresentaram uma maior concentração de organismos no esfregaço de *buffy-coat*. Nos casos com *Babesia*, as contagens obtidas no esfregaço de *buffy-coat* foram superiores em dez observações e inferiores em duas, relativamente ao método no esfregaço sanguíneo, tendo-se observado ainda valores idênticos nas duas restantes observações. Relativamente à morfologia dos organismos, verificou-se haver uma ligeira diferença na apresentação dos organismos de *Babesia* quando comparando os métodos. Pelo contrário, a morfologia nas microfilárias foi similar por ambos os métodos. Assim, os resultados obtidos parecem indicar que haja um aumento do número de organismos encontrados pelo esfregaço de *buffy-coat*, quando comparado com o esfregaço sanguíneo. Porém, será necessário aumentar o número da amostra, de modo a poder-se retirar conclusões estatisticamente significativas.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ricardo Marcos por ter aceite ser o meu orientador e por toda a ajuda, disponibilidade e conhecimento que me transmitiu.

À professora Marta Santos, minha co-orientadora, por tudo o que me ensinou durante o estágio e por todo o apoio e ajuda que disponibilizou.

À doutora Vanessa Silva, minha co-orientadora, por me ter recebido no Segalab, e por toda a ajuda, apoio e conhecimento que me transmitiu ao longo do estágio.

A toda a equipa dos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS, no Laboratório de Histologia e Embriologia, em particular à Fernanda Malhão e Célia Lopes, por me terem recebido de braços abertos e partilhado os seus conhecimentos e simpatia durante estes meses.

A toda a equipa do laboratório Segalab por me ter recebido, em especial à doutora Abigail Barbosa por me ter concedido a oportunidade de vir aprender no Segalab. Ao Paulo e ao Tiago por tudo o que me ensinaram e pelo apoio e simpatia que sempre demonstraram. À Ana Loureiro e à Margarida pela simpatia e apoio que demonstraram durante todo o estágio.

Ao meu tio Mani pela ajuda na análise estatística do trabalho e pelo apoio e ajuda disponibilizada.

À minha família pelo apoio e carinho durante a minha vida e por toda a ajuda que sempre disponibilizaram. Durante este período de estágio um especial agradecimento à minha mãe por todo o apoio e encorajamento.

Aos amigos que fiz durante o curso, que me apoiaram neste percurso e pela sua amizade, em especial à Ana Cristina, Joana, Rute, Sara e Vanessa.

E um agradecimento especial aos cãesinhos que passaram pela minha vida, o Felix, o Toby e a Daisy.

LISTA DE ABREVIATURAS

° C – Graus Celsius

% – Percentagem

µl – Microlitro

B. canis – *Babesia canis*

B. conradae – *Babesia conradae*

B. gibsoni – *Babesia gibsoni*

B. “microti-like” – *Babesia “microti-like”*

B. rossi – *Babesia rossi*

B. vogeli – *Babesia vogeli*

D. immitis – *Dirofilaria immitis*

D. repens – *Dirofilaria repens*

EDTA – Etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

IFI – Imunofluorescência indireta

PCR – Polymerase Chain Reaction

Rpm – Rotações por minuto

SRD – Sem Raça Determinada

ÍNDICE GERAL

RESUMO	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
ÍNDICE GERAL	iv
ÍNDICE DE IMAGENS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	vi
INTRODUÇÃO	1
MEIOS DE DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITAS	2
Esfregaço sanguíneo.....	2
Diagnóstico de hemoparasitas	4
<i>Buffy-coat</i>	4
Diagnóstico de hemoparasitas	6
HEMOPARASITAS EM CÃES	7
BABESIA	7
Etiologia e Distribuição geográfica	7
Ciclo de Vida	8
Sintomatologia e Alterações hematológicas e bioquímicas.....	9
Métodos de Diagnóstico.....	11
Detecção Molecular	11
Detecção Serológica.....	12
Esfregaço Sanguíneo	13
Esfregaço de <i>Buffy-coat</i>	14
DIROFILÁRIA	14
Etiologia e Distribuição geográfica	14
Ciclo de Vida	15
Sintomatologia e Alterações hematológicas e bioquímicas.....	17
Métodos de Diagnóstico.....	18
Detecção Molecular	18
Detecção Serológica.....	18
Pesquisa de microfilárias.....	19
Teste Modificado de Knott.....	20
Teste de Filtração	20

Esfregaço Sanguíneo	20
Utilização do <i>buffy-coat</i>	21
OBJETIVOS	21
MATERIAIS E MÉTODOS	21
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	27
BIBLIOGRAFIA	28
ANEXO I – Atividades Desenvolvidas Durante o Estágio Curricular	31
ANEXO II - Caracterização da Amostra em Estudo	35

ÍNDICE DE IMAGENS

Figura 1: Preparação de esfregaço sanguíneo.....	3
Figura 2: A: Bom esfregaço sanguíneo já corado B: Divisão do esfregaço em três zonas: corpo, monocamada e cauda.....	3
Figura 3: Tubo de microhematócrito. Distribuição das células na camada de <i>buffy-coat</i>	5
Figura 4: Esquematização do ciclo de vida da <i>Babesia</i> spp.	9
Figura 5: Esquematização do ciclo de vida da <i>Dirofilaria immitis</i>	16
Figura 6: Microfilária de <i>Dirofilaria immitis</i> no esfregaço sanguíneo (A), com ampliação da cavidade cefálica, que permite observar uma zona grande não corada característica desta espécie (B). No esfregaço de <i>buffy-coat</i> a morfologia das microfilárias era idêntica (C).	24
Figura 7: A: Observação de duas formas de <i>Babesia</i> grande dentro de um eritrócito no esfregaço sanguíneo. B: Observação de formas de <i>Babesia</i> livres no esfregaço de <i>buffy-coat</i> e de um organismo dentro de um eritrócito (seta).....	25

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: A: Comparação entre o esfregaço sanguíneo e de <i>buffy-coat</i> na detecção de <i>Babesia</i> na população em estudo. B: Comparação entre o esfregaço sanguíneo e de <i>buffy-coat</i> na detecção de microfilárias na população em estudo	22
Tabela 2: Contagem do número de <i>Dirofilaria immitis</i> presente no esfregaço sanguíneo e de <i>buffy-coat</i>	23

Tabela 3: Contagem do número de <i>Babesia</i> spp. presente no esfregaço sanguíneo e de <i>buffy-coat</i> em 10 campos de grande ampliação.	23
Tabela 4: Mediana (intervalo) das contagens dos hemoparasitas no esfregaço sanguíneo e no esfregaço de <i>buffy-coat</i>	23
Tabela 5: Casuística nos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS, no Laboratório de Histologia e Embriologia entre o dia 3 de abril e 28 de maio.	33
Tabela 6: Diagnóstico dos casos de rotina recebidos nos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS, no Laboratório de Histologia e Embriologia entre o dia 3 de abril e 28 de maio.....	33
Tabela 7: Diagnóstico dos casos de arquivo observados entre o dia 3 de abril e 28 de maio nos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS, no Laboratório de Histologia e Embriologia.....	34
Tabela 8: Caracterização dos animais onde foi possível a identificação de microfilárias no esfregaço sanguíneo e no esfregaço de <i>buffy-coat</i> . SRD – Sem Raça Determinada.....	35
Tabela 9: Caracterização dos animais onde foi possível a identificação de organismos de <i>Babesia</i> spp. no esfregaço sanguíneo e no esfregaço de <i>buffy-coat</i> . SRD – Sem Raça Determinada	36
Tabela 10: Valores do hematócrito, do número de plaquetas e de leucócitos nos animais com dirofilariose. Os valores inferiores aos valores de referência estão a vermelho. Valores de referência para o hematócrito: 37%-55%. Valores de referência para o número de plaquetas: 200 x 10 ³ /μl – 500 x 10 ³ /μl. Valores de referência para o número de leucócitos: 6,0 x 10 ³ /μl – 17,0 x 10 ³ /μl.	37
Tabela 11: Valores do hematócrito, do número de plaquetas e de leucócitos nos animais com babesiose. Os valores inferiores aos valores de referência estão a vermelho. Valores de referência para o hematócrito: 37%-55%. Valores de referência para o número de plaquetas: 200 x 10 ³ /μl – 500 x 10 ³ /μl. Valores de referência para o número de leucócitos: 6,0 x 10 ³ /μl – 17,0 x 10 ³ /μl....	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Valores da contagem no esfregaço de <i>buffy-coat</i> versus contagem no esfregaço sanguíneo para o hemoparasita <i>Dirofilaria immitis</i>	24
Gráfico 2: Distribuição das amostras pelos distritos de Portugal.....	35

INTRODUÇÃO

Os hemoparasitas são agentes que apresentam tropismo para as células sanguíneas. A infecção ocorre, na maioria das vezes, através da transmissão do agente por um vetor. As carraças, as pulgas, os mosquitos e os flebótomos são alguns dos vetores que podem transmitir o parasita, bactéria ou protozoário aos animais ao se alimentarem do seu sangue. Em alguns casos, a infecção ocorre através da ingestão do vetor. Assim, os animais funcionam como reservatórios e hospedeiros no ciclo de vida dos hemoparasitas (Shaw *et al.* 2001; Otranto & Dantas-Torres 2010).

Nos últimos anos tem havido um aumento do interesse nos hemoparasitas transmitidos por vetores, devido a este problema ter assumido uma distribuição mundial. Para além de causar sérias patologias em regiões tropicais e semi-tropicais, estes agentes já são reconhecidos como a causa de doenças em cães e gatos em regiões de climas temperados e em ambientes urbanos. Para além disso, com o aumento da população de cães, o seu papel social em países desenvolvidos e a próxima relação com os humanos levou a um aumento da preocupação com a saúde pública humana, devido ao potencial zoonótico (Shaw *et al.* 2001; Otranto *et al.* 2009).

A distribuição geográfica dos hemoparasitas está intimamente ligada com a distribuição dos vetores. Assim, o aumento da distribuição geográfica deveu-se à introdução do vetor em áreas anteriormente livres. Os principais fatores responsáveis por este aumento são as alterações climáticas, que alteram a distribuição geográfica e temporal dos vetores, o aumento do comércio internacional, bem como da mobilidade do homem e dos animais. A pressão antropogénica sobre o ambiente, através da desflorestação e a rápida urbanização, desempenhou um papel relevante. Para além disso, a capacidade de os vetores se ambientarem a diferentes condições climáticas e o aumento das resistências aos fármacos usados também levaram ao aumento da prevalência de hemoparasitas (Shaw *et al.* 2001; Otranto *et al.* 2009).

Os agentes etiológicos transmitidos por vetores de maior importância para a medicina veterinária a nível global são: *Anaplasma*, *Babesia*, *Dirofilaria*, *Ehrlichia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* (Caprariis *et al.* 2011). A *Dirofilaria* apesar de não parasitar nenhuma célula sanguínea, é um parasita que tem parte do seu ciclo de vida no sangue, pelo que também pode ser diagnosticado através da visualização no esfregaço sanguíneo. Deste modo, a sua presença também foi avaliada neste trabalho.

Quando um animal é exposto a carraças, podem ocorrer múltiplas infeções por diferentes agentes etiológicos. A mesma carraça poderá ser portadora de diferentes parasitas ou podem ser transmitidas por diferentes carraças ou até por diferentes vetores. Em cães, a co-infeção com

Ehrlichia, *Bartonella*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* ocorrem em zonas endêmicas (Shaw *et al.* 2001).

Devido ao aumento do número de casos positivos a hemoparasitas, tornou-se essencial refinar os meios de diagnóstico disponíveis. O diagnóstico requer uma combinação entre sinais clínicos compatíveis e os achados laboratoriais. A pesquisa dos hemoparasitas poderá ser feita através de métodos serológicos, moleculares ou através da sua observação no microscópio (Shaw *et al.* 2001). Este trabalho focou-se no diagnóstico de hemoparasitas através da sua observação microscópica. Assim, avaliou-se se o uso de esfregaços de *buffy-coat* trariam alguma vantagem em relação à avaliação do esfregaço sanguíneo.

MEIOS DE DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITAS

Esfregaço sanguíneo

O esfregaço sanguíneo é um método de diagnóstico fundamental para a avaliação do estado de saúde do animal, podendo fornecer informação que não pode ser obtida através das máquinas de hemograma. Deste modo, o esfregaço sanguíneo deve ser considerado um método complementar ao hemograma e observado em todas as amostras (Villiers 2007; Weiss & Tvedten 2012; Valenciano *et al.* 2014).

Para a realização do esfregaço sanguíneo o sangue deve ser colhido de uma veia de médio ou de grande calibre. Este deverá ser utilizado imediatamente para a realização do esfregaço sanguíneo, ou poderá ser armazenado num tubo com anticoagulante. A utilização do sangue sem anticoagulante será preferível quando temos um volume limitado, ou de modo a evitar alterações morfológicas causadas pela presença do anticoagulante. Quando o esfregaço não é realizado logo após a colheita, dever-se-á armazenar o sangue num tubo com anticoagulante, de preferência ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), já que preserva a morfologia celular de amostras refrigeradas até 24 horas após colheita, ao contrário de outros anticoagulantes, como a heparina. O citrato também pode ser utilizado para avaliar a morfologia celular, mas como é necessário diluir a amostra em 10%, interfere com as contagens celulares manuais. O tubo de sangue deverá ser enchido até à marca de cada tubo, de modo a ter a proporção de sangue ideal para a quantidade de anticoagulante no tubo (Weiss & Tvedten 2012; Valenciano *et al.* 2014).

A utilização de um esfregaço sanguíneo bem feito é essencial para a correta avaliação dos elementos sanguíneos. Deste modo, para a realização do esfregaço deve-se colocar uma pequena gota de sangue misturado na ponta de uma lâmina limpa. Com a ajuda de outra lâmina colocada

em ângulo sobre a superfície da primeira, devemos puxá-la para trás até estar em contacto com a gota de sangue; de seguida, puxá-la para a frente num movimento contínuo, rápido e suave, de modo a espalhar o sangue pela lâmina (figura 1). O ângulo entre as duas lâminas pode variar conforme o tamanho do esfregaço que se quer, sendo que um ângulo menor produz um esfregaço maior. Assim, pode-se usar um ângulo maior em casos de sangue muito anémicos, e um ângulo menor quando há hemoconcentração. De qualquer modo, o esfregaço não deverá ser tão longo ao ponto de se estender até ao fim da lâmina, uma vez que poderá perder a zona de monocamada, essencial para avaliar os elementos sanguíneos (Weiss & Tvedten 2012; Valenciano *et al.* 2014).

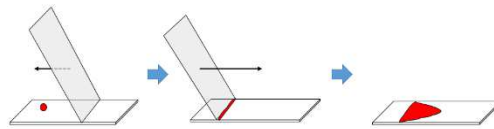


Figura 1: Preparação de esfregaço sanguíneo.

Após a realização do esfregaço sanguíneo, deve-se corar a lâmina, sendo que as colorações do tipo Romanowsky são ideais para a sua avaliação microscópica. Destas, a coloração Diff-Quik® pode ser vantajosa em relação à coloração de Wright, já que é menos sensível ao pH, é mais rápida e menos suscetível à formação de precipitado. Porém, é mais difícil a visualização de policromasia, presente em eritrócitos imaturos, de grânulos de algumas células e de alterações tóxicas dos neutrófilos (Valenciano *et al.* 2014).

Um bom esfregaço sanguíneo é constituído por três zonas: o corpo, a monocamada e a cauda do esfregaço. O corpo é a zona mais espessa do esfregaço, onde as células estão contraídas e distorcidas, sendo impossível a avaliação morfológica e complicado efetuar a contagem diferencial dos leucócitos. Na monocamada as células sanguíneas estão lado a lado, em que cerca de 50% estão-se a tocar, mas sem se sobrepôr. Para além disso, as células não estão distorcidas e os leucócitos estão uniformemente distribuídos. Esta é a zona ideal para avaliar a morfologia e fazer a contagem diferencial dos leucócitos. A monocamada pode ser encontrada na metade distal do esfregaço, adjacente à cauda, e pode ser identificada como uma zona luminescente quando se segura a lâmina não corada à luz. A cauda do esfregaço é a zona mais externa, localizada no ponto oposto ao local da aplicação da gota de sangue. Esta é a área ideal para procurar organismos, agregados plaquetários e células grandes atípicas ou células neoplásicas, por ser onde se encontram as células mais pesadas (Harvey 2012; Valenciano *et al.* 2014).

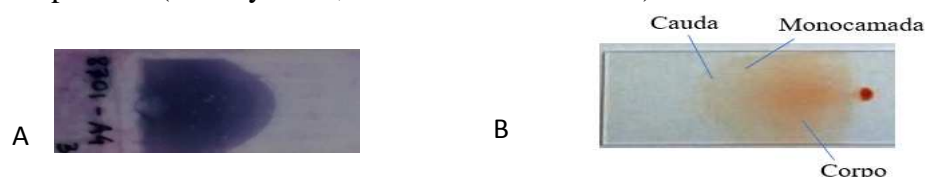


Figura 2: A: Bom esfregaço sanguíneo já corado B: Divisão do esfregaço em três zonas: corpo, monocamada e cauda.

Diagnóstico de hemoparasitas

O esfregaço sanguíneo pode ser utilizado como meio de diagnóstico de hemoparasitas. A zona preferível para a sua procura é a cauda do esfregaço. Estes organismos podem parasitar diferentes células sanguíneas, pelo que podem ser observadas nos eritrócitos, leucócitos, plaquetas ou livres no fundo do esfregaço (Harvey 2012; Valenciano *et al.* 2014).

Dentro dos parasitas eritrocitários pode-se encontrar *Mycoplasma hemocanis* e *Mycoplasma hemofelis* que são bactérias gram-positivas, corados de azul escuro, que se apresentam sob a forma de pontos ou bastonetes na superfície dos eritrócitos dos cães ou dos gatos, respetivamente. *Cytauxzoon felis* é outro hemoparasita que pode ser observado no esfregaço, apresentando-se sob a forma de um anel de sinete dentro dos eritrócitos. Pode-se ainda encontrar *Babesia* spp. que pode ser distinguida em *Babesia* grande, em forma de pera, ovoides ou ovais e *Babesia* pequena com a forma de um anel de sinete (Harvey 2012; Valenciano *et al.* 2014).

Nos leucócitos pode-se visualizar *Ehrlichia* / *Anaplasma* spp. sob a forma de uma mórula dentro dos monócitos ou dos neutrófilos. Para além disso, pode-se encontrar *Hepatozoon* spp. em cães que ingeriram carraças infetadas. Este hemoparasita apresentam-se como estruturas elípticas transparentes a azuis dentro do citoplasma dos neutrófilos ou dos monócitos. No interior das plaquetas pode-se encontrar *Anaplasma platys* sob a forma de grupos azuis escuros (Harvey 2012; Valenciano *et al.* 2014).

Por fim, pode-se encontrar parasitas livres no fundo do esfregaço, como microfilárias, *Trypanosoma* spp., espiroquetas ou bactérias (Valenciano *et al.* 2014).

Buffy-coat

O *buffy-coat* é obtido através da centrifugação de sangue armazenado com anticoagulante em tubos capilares. Assim, é necessário encher um tubo de microhematócrito, por capilaridade, até, aproximadamente, $\frac{2}{3}$ a $\frac{3}{4}$ da sua capacidade com sangue. Depois de selado com plasticina numa das pontas do tubo, este é colocado, com a plasticina orientada para a periferia, numa centrífuga específica e centrifugado durante 5 minutos. A centrífuga deverá estar equilibrada, ou seja, dever-se-á colocar um outro tubo de microhematócrito no lado oposto. Após a centrifugação, a amostra de sangue é separada em três camadas, baseadas na sua densidade. Na camada de baixo ficam depositados os eritrócitos. Acima desta camada pode-se visualizar uma camada branca, denominada de *buffy-coat*, onde estão os leucócitos e as plaquetas, e, por sua vez, por cima do *buffy-coat* encontra-se o plasma acelular (Harvey 2012; Weiss & Tvedten 2012). O *buffy-coat*, por sua vez, pode ser dividido em 3 camadas: na camada de cima estão as plaquetas, na do meio estão

os linfócitos e os monócitos e na camada de baixo estão os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) (figura 3) (Sirois 2017).

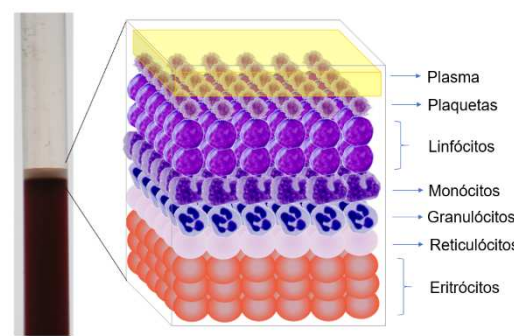


Figura 3: Tubo de microhematócrito. Distribuição das células na camada de *buffy-coat*.

Os tubos de microhematócrito permitem avaliar o hematócrito do animal, ao determinar a fração de sangue total que é ocupado por eritrócitos. Este método é considerado o *gold standard* na determinação do hematócrito quando comparado com as máquinas de hemograma (Stockham & Scott 2008). Ao analisar este valor deve-se ter em consideração que quando o hematócrito é superior a 50%, a camada de eritrócitos fica menos compacta, levando a uma sobrestimação do valor real. Pelo contrário, quando o hematócrito é inferior a 25%, os eritrócitos estão mais compactos, levando a uma subestimação do valor real. Para além disso, os tubos de microhematócrito fornecem informações importantes sobre a aparência do plasma. Normalmente o plasma é transparente na maioria das espécies. Quando o plasma apresenta uma cor amarelada (ictérico), significa que há uma maior concentração de bilirrubina. Isto pode acontecer em situações de lesão hepático. Quando, por sua vez, o plasma tem uma cor avermelhada, significa que há um aumento de hemoglobina. Esta coloração pode ocorrer em situações de hemólise intravascular ou como artefacto, devido a uma colheita difícil de sangue, presença de células frágeis ou grandes tempos de armazenagem. A presença de um hematócrito normal, pode indicar que a hemólise ocorreu após a colheita. Nos casos de lipemia o plasma apresenta-se com uma cor branca opaca e com uma camada branca em cima da coluna de plasma. Esta aparência pode ocorrer por o animal ter-se alimentado recentemente ou devido a patologias, como *diabetes mellitus* ou pancreatites. O tubo de microhematócrito poderá, ainda, servir para determinar a concentração de proteína no plasma, ao colocar parte do plasma num refratómetro (Harvey 2012; Weiss & Tvedten 2012). Por fim, também é possível observar microfilárias entre o *buffy-coat* e o plasma num microscópio com baixa ampliação (100x) (Sirois 2017).

Ao avaliar o *buffy-coat* podemos, ainda, retirar mais informação sobre o estado de saúde do animal. Normalmente, a camada de *buffy-coat* ocupa, aproximadamente, 0,5 a 1% do volume

do sangue (Stockham & Scott 2008). A espessura desta camada está, geralmente, associada ao número de leucócitos ou plaquetas presentes no sangue. Assim, um *buffy-coat* de maior tamanho sugere a presença de leucocitose ou de trombocitose (Harvey 2012). A leucocitose pode ser estimada pela percentagem que a camada de *buffy-coat* ocupa. O primeiro 1% equivale a aproximadamente $10 \times 10^9/l$ e cada aumento percentual em seguida equivale a aproximadamente $20 \times 10^9/l$ (Villiers 2007). Para além disso, o *buffy-coat* pode-se apresentar com uma coloração avermelhada, devido a uma reticulocitose marcada. Para obtermos ainda mais informação, podemos realizar um esfregaço de *buffy-coat* (Harvey 2012). Assim, precisamos de cortar o tubo de microhematócrito centrifugado junto ao *buffy-coat* e, em seguida, depositar essa camada numa lâmina limpa. Para fazer o esfregaço, poder-se-á utilizar a mesma técnica que se usa no esfregaço sanguíneo, anteriormente descrita (Sirois 2017).

O esfregaço de *buffy-coat* é utilizado principalmente para avaliar a presença de células atípicas ou neoplásicas, como mastócitos e linfoblastos, e de agentes infecciosos (Garrett *et al.* 2007; Sirois 2017). Apesar de no esfregaço haver, principalmente, um aumento do número de leucócitos e de plaquetas, podem ser observados, também, eritrócitos. Assim, se houver bastantes eritrócitos nucleados e reticulócitos, estes também vão aparecer no esfregaço, já que estas células se encontram na porção superior da camada dos eritrócitos (Sirois 2017).

Diagnóstico de hemoparasitas

O esfregaço de *buffy-coat* pode ser usado para o diagnóstico de hemoparasitas. Em medicina humana este método de diagnóstico tem sido utilizado, principalmente, em casos de malária, dirofilariose e de leishmaniose (Ahmed & Samantaray 2014). Em medicina veterinária os estudos têm sido feitos, principalmente, em animais infetados com *Dirofilaria* e *Hepatozoon* spp..

A maioria dos estudos usa a observação de microfilárias no tubo de microhematócrito centrifugado num microscópio em baixa ampliação (100x) (Sirois, 2017). Porém, atualmente, já têm sido efetuados estudos em que utilizaram esfregaços de *buffy-coat* como método de diagnóstico (Marcos *et al.* 2016).

Num estudo realizado em 2011 por Otranto *et al.*, o PCR através do *buffy-coat* mostrou ser o método de diagnóstico mais sensível de *Hepatozoon canis*. Quando comparado apenas o esfregaço sanguíneo ao de *buffy-coat*, este último demonstrou ter uma maior sensibilidade.

Apesar de não se ter encontrado estudos feitos sobre esfregaços de *buffy-coat* em animais com leishmaniose, em medicina humana Salam *et al.* demonstrou em 2012 que este método de diagnóstico poderá ser útil, por ser um método simples e com uma boa precisão diagnóstica.

HEMOPARASITAS EM CÃES

Dos esfregaços avaliados para este trabalho, apenas se encontrou microfilárias e *Babesia* em cães. Por esta razão, apenas serão abordados estes dois agentes.

BABESIA

Babesia spp. é um protozoário, transmitido através da carrapa, que infeta várias espécies de animais, bem como humanos (Solano-Gallego & Baneth 2011). Atualmente, as espécies de *Babesia* estão distribuídas mundialmente (Cardoso 2008).

A *Babesia* foi primeiramente identificado há mais de um século pelo Dr. Victor Babes em bovinos com hemoglobinúria e, mais tarde, em ovelhas. Estes organismos foram depois denominados, respetivamente, como *Babesia bovis* e *Babesia ovis*. Em cães foi descrito, pela primeira vez, em Itália, pouco depois da descoberta em bovinos (Solano-Gallego *et al.* 2016).

Etiologia e Distribuição geográfica

A *Babesia* é um protozoário que parasita os eritrócitos. Outro termo usado para descrever este agente é piroplasma, já que quando observados no esfregaço sanguíneo apresentam uma forma semelhante a uma pera. Este termo não é exclusivo, uma vez que para além da *Babesia*, a *Theileria* também é denominada de piroplasma (Irwin 2010).

Inicialmente, a diferenciação entre as várias espécies de *Babesia* era feita através do seu aspeto morfológico, quando eram observadas no esfregaço sanguíneo. Assim, podiam-se distinguir através do seu tamanho, como formas de *Babesia* grande (3-5µm) e de *Babesia* pequena (1-3µm). Mais tarde, com o aparecimento de técnicas moleculares, foi possível identificar várias espécies de *Babesia* destes dois grupos, que podem infetar os cães (Irwin 2009; Solano-Gallego *et al.* 2016).

Relativamente às formas de *Babesia* grande, anteriormente consideradas como sendo todas *Babesia canis*, podem ser divididas em três espécies distintas: *B. canis*, *B. rossi* e *B. vogeli*. Anteriormente, estas três espécies eram consideradas como subespécies de *Babesia canis*, devido à sua morfologia semelhante. No entanto, como estas apresentam diferenças na sintomatologia, distribuição geográfica e especificidade de vetores, foram consideradas como espécies diferentes. Para além disso, foi descoberta uma nova espécie de *Babesia* grande, relacionada com a *Babesia bigemina* (Solano-Gallego *et al.* 2016).

Relativamente às formas de *Babesia* pequena, foram apenas descritas três espécies com importância clínica: *B. gibsoni*, *B. conradae* e *B. "microti-like"*. Esta última espécie também é

denominada com *Theileria annae* e foi sugerido, mais recentemente, que se denominasse de *Babesia vulpes*, devido ao seu hospedeiro natural e por não apresentarem nenhuma fase pré-eritrocitária de infecção nos linfócitos, característica que diferencia a *Babesia* de *Theileria*. Porém, ainda não há consenso sobre estes termos (Solano-Gallego *et al.* 2016).

Para além destas espécies de *Babesia*, já foram identificados, através de métodos moleculares, a presença de cães infetados com *Theileria equi*, *Theileria annulata* e *Babesia caballi*. No entanto, o significado clínico e epidemiológico destas infeções continua a ser desconhecido (Solano-Gallego *et al.* 2016).

A distribuição geográfica de *Babesia* depende da presença dos vetores de cada espécie. A *B. rossi* apenas foi descrita em África e a *B. canis* tem sido reportada, essencialmente, na Europa. Pelo contrário, *B. vogeli* e *B. gibsoni* estão distribuídos mundialmente. Na Europa ainda não foram identificadas todas as espécies, sendo que foram encontradas *B. canis*, *B. vogeli*, *B. microti-like* e *B. gibsoni* (Solano-Gallego & Baneth 2011; Solano-Gallego *et al.* 2016). Em Portugal foram descritas a presença de *Babesia canis*, de *Babesia vogeli* (Cardoso *et al.* 2008) e de *Babesia microti-like* (Simões *et al.* 2011). Apesar de não se terem encontrado descrições de casos de *B. gibsoni* em Portugal, está documentada a sua ocorrência em Espanha (Solano-Gallego & Baneth 2011).

Ciclo de Vida

A transmissão da *Babesia* aos cães ocorre quando a carraça infetada se alimenta do seu sangue. Todas as espécies de *Babesia* spp. que parasitam o cão são transmitidas por um vetor ixodídeo (carraças de corpo duro). No caso da *Babesia canis*, o vetor mais relevante é a carraça *Dermacentor reticulatus*. Sendo o Outono e a Primavera as alturas do ano mais favoráveis para a atividade desta carraça, há um aumento de *B. canis* nessas estações. Dependendo da espécie, a transmissão para o hospedeiro canino ocorre através de um dos estádios do ciclo de vida da carraça: larva, ninfa ou adulto. No caso da carraça *Rhipicephalus sanguineus*, pelo menos, os três estádios podem transmitir *B. vogeli* (Palmer 2002; Irwin 2010; Solano-Gallego & Baneth 2011; Solano-Gallego *et al.* 2016).

Quando a carraça infetada se alimenta do sangue dos cães, os esporozoítos passam das glândulas salivares do vetor para o tecido subcutâneo e para o sangue do hospedeiro canino. Em algumas espécies de *Babesia*, como a *B. canis*, a carraça tem de estar em contacto com o hospedeiro durante vários dias (2 a 3 dias) para que ocorra a transmissão. Assume-se que a diferença de temperaturas ou a ingestão de sangue pela carraça possa ser o estímulo necessário

para a maturação dos esporozoítos. Depois de se encontrar na corrente sanguínea, o parasita invade os eritrócitos, onde se multiplica, libertando merozoítos que invadem mais eritrócitos (reprodução assexuada). Os merozoítos podem-se dividir várias vezes, formando oito ou mais parasitas no mesmo eritrócito, o que eventualmente leva à destruição deste elemento sanguíneo. A transmissão do protozoário para o vetor pode ocorrer em qualquer momento em que exista parasitemia e que a carraça se alimente do sangue do cão. Os organismos ingeridos pelas carraças desenvolvem-se por reprodução sexuada no intestino, seguida por esporogonia nos tecidos. Depois, o parasita migra para as células das glândulas salivares da carraça, até que esta se alimente novamente, ou migra para os ovários do vetor, de modo a haver transmissão transovárica para as próximas gerações de carraças (figura 4) (Irwin 2010; Solano-Gallego & Baneth 2011).



Figura 4: Esquematização do ciclo de vida da *Babesia* spp.

Apesar da *Babesia* ser transmitida essencialmente através de vetores, já foram reportadas infeções em recém-nascidos por *B. canis* e *Babesia microti*-like, que foram infetados por transmissão transplacentária e infeções em animais por transfusões sanguíneas, em que o sangue do dador estava infetado. Relativamente à *B. gibsoni* já foram reportados vários casos que suportam a ideia que possa ser transmitido através de contacto direto entre cães através de lesões, devido a lutas entre cães, saliva ou ingestão de sangue. Esta é uma das principais razões por detrás da distribuição mundial desta espécie de *Babesia* (Irwin 2010; Solano-Gallego *et al.* 2016).

Sintomatologia e Alterações hematológicas e bioquímicas

A severidade de uma infeção por *Babesia* varia de subclínica até à falência dos órgãos e morte do animal. A maior parte dos cães apresenta diferentes graus de anemia, febre, esplenomegalia, icterícia e pigmentúria (hemoglobinúria e bilirrubinúria). Relativamente às alterações hematológicas, os sinais mais comuns são a presença de anemias hemolíticas e trombocitopenias. A sintomatologia apresentada pode variar conforme a espécie que parasita o

animal e a presença de co-infecções. Quando há múltiplos agentes etiológicos, os sinais clínicos podem ser confusos. Também têm influência a idade e o sistema imunitário do hospedeiro, sendo que os animais mais jovens tendem a desenvolver sintomatologia mais grave do que cães adultos (Irwin 2010; Solano-Gallego *et al.* 2016). Para além disso, no caso da *Babesia rossi*, a densidade parasitária foi considerada um fator relacionado com a severidade da doença. Nas outras espécies de *Babesia*, ainda há pouca informação sobre este fator (Solano-Gallego *et al.* 2016).

A virulência também varia com a espécie de *Babesia*. Dentro das *Babesia* grandes, a *B. vogeli* é a menos patogénica em animais adultos, e a mais virulenta é a *B. rossi*. A patogenicidade das espécies de *Babesia* pequena é moderada a severa (Solano-Gallego *et al.* 2016).

A babesiose pode ser classificada como complicada ou não complicada. Nesta última, os cães apresentam ligeira a moderada anemia, que causa palidez, fraqueza, icterícia, febre e pigmentúria. A babesiose complicada ocorre quando a sintomatologia não pode ser explicada apenas pela hemólise, sendo caracterizada por falência de um ou mais órgãos e por uma elevada mortalidade. Este tipo de babesiose tem sido mais estudada em relação à *B. rossi* (Irwin 2010). Ainda assim, estes quadros representam infeções agudas, porque em infeções crónicas de *Babesia* pode não estar presentes qualquer sintomatologia (Solano-Gallego *et al.* 2016).

A severidade da anemia não está relacionada com o grau de parasitemia, pelo que foi considerada a hipótese de a anemia não ocorrer exclusivamente por lesão direta dos eritrócitos (Irwin 2010). Propõe-se que esta lise celular se deva, também, a danos oxidativos, causados por toxinas hemolíticas. Também a ligação de anticorpos à membrana celular, a ativação do complemento e o aumento da fagocitose dos eritrócitos parecem contribuir. Estes mecanismos imuno-mediados resultam em hemólise intra e extra-vascular (Irwin 2010; Solano-Gallego & Baneth 2011). Ainda assim, a presença de anticorpos na membrana dos eritrócitos apenas foi documentada em *B. gibsoni* e *B. vogeli* (Solano-Gallego & Baneth 2011). Nem todos os cães apresentam anemia. Porém, alguns animais apresentam sinais de regeneração, apesar do número de eritrócitos se encontrar dentro dos valores de referência. De facto, alguns cães apresentam uma anemia pré-regenerativa. Nos casos em que há anemia pode-se, por vezes, observar a presença de uma anemia hemolítica imuno-mediada, ou seja, existência de auto-aglutinação, com teste de Coombs positivo, e/ou a presença de esferócitos (Irwin 2010). No caso da *Babesia canis*, a anemia parece ser não regenerativa (Solano-Gallego & Baneth 2011).

A presença de uma trombocitopenia moderada a severa é extremamente comum. Aliás, num estudo realizado na África do Sul, foi sugerido que a probabilidade de um animal estar infetado com *Babesia* e não ter trombocitopenia era menor que 1% (Irwin 2010). Esta diminuição

do número de plaquetas pode dever-se a uma trombocitopenia imuno-mediada, a um sequestro das plaquetas no baço ou ao seu consumo, devido à lesão hemolítica ou vascular (Solano-Gallego & Baneth 2011). Apesar de haver uma diminuição do número de plaquetas, um estudo realizado por Goddard *et al.* em cães infetados por *B. rossi*, verificou que as plaquetas presentes são plaquetas ativadas de grandes dimensões, o que pode explicar não haver, habitualmente, sangramento clínico (Goddard *et al.* 2015). Para além disso, apesar de haver uma trombocitopenia, a presença de coagulopatias não são muito comuns, sendo apenas encontradas em situações de coagulopatia intravascular disseminada ou quando há co-infeções (Irwin 2010).

As análises bioquímicas em cães infetados são geralmente inespecíficas, refletindo a presença de hipoxemia e de hemólise. Tipicamente, há a presença de aumentos ligeiros a moderados das concentrações de alanina aminotransferase, de aspartato aminotransferase, de fosfatase alcalina, de bilirrubina e, por vezes, de azotémia com origem pré-renal ou renal (Irwin 2010). Para além disso, pode-se encontrar uma hipoalbuminemia (Solano-Gallego *et al.* 2016).

Métodos de Diagnóstico

A suspeita de babesiose deve ser baseada na: 1) sintomatologia, que deverá ser compatível com esta suspeita; 2) ocorrência de anemia ou trombocitopenia; 3) história de carraças ou de lutas entre cães; 4) localização geográfica, se vive ou visitou uma zona endémica de carraças que transmitem *Babesia* (Irwin 2010). Estes animais devem ser sujeitos a testes diagnósticos. Apesar das metodologias diagnósticas terem melhorado, ainda não existe nenhum método que ofereça 100% de certezas. (Irwin 2010). Assim, estão disponíveis testes serológicos e moleculares para o diagnóstico deste protozoário. A *Babesia* pode ainda ser identificada por visualização no microscópio de esfregaços sanguíneos e de esfregaços de *Buffy-coat*.

Deteção Molecular

O PCR (“Polymerase Chain Reaction”) revolucionou o diagnóstico de organismos infecciosos e de parasitas, principalmente no caso de agentes demasiado pequenos para serem observados no microscópio ou quando o número de organismos infetantes é muito baixo. No caso da *Babesia*, este método veio ajudar muito na sua deteção, principalmente em situações de baixa parasitemia (Irwin 2010). Para a realização do PCR, deve-se submeter sangue em tubo com EDTA, ou então utilizar tecido esplénico, mas esta última envolve um procedimento muito mais invasivo (Solano-Gallego *et al.* 2016).

O PCR é um método muito mais sensível quando comparado com a detecção em esfregaços sanguíneos. Para além disso, quando é positivo permite diferenciar as várias espécies de *Babesia* (Solano-Gallego *et al.* 2016). Porém, apesar de ser um teste de alta sensibilidade, podem ocorrer falsos negativos em casos de babesiose crónica. Assim, é importante ter presente este facto em casos de animais dadores de sangue assintomáticos (Irwin 2010).

O PCR pode ser muito útil depois do tratamento para saber se ainda há infeção ou se, muito provavelmente, já não existe. Assim, o PCR deve ser usado 2 meses após ter-se terminado o tratamento. Como é possível haver falsos negativos, deve-se repetir o teste 15 dias depois. Em teoria, para se confirmar com certeza absoluta seria necessário usar várias aspirações de tecidos, como do baço, para além do sangue periférico. Porém, devido ao seu custo e caráter invasivo, esta utilização do PCR para confirmar a ausência de infeção, é usado apenas em investigação (Solano-Gallego *et al.* 2016).

Deteção Serológica

Os testes serológicos são importantes em animais assintomáticos e em casos crónicos, em que o grau de parasitemia é baixo. Nesses casos é difícil de detetar em esfregaços sanguíneos (Dantas-Torres & Figueredo 2006). A serologia pode indicar a presença de infeção, antiga ou recente. Os métodos de deteção serológica incluem o teste de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”). Uma das vantagens para a deteção serológica é a capacidade de determinar os níveis de anticorpos, e desta forma permitir estabelecer se são altos ou baixos (Solano-Gallego & Baneth 2011; Solano-Gallego *et al.* 2016).

O teste de IFI já é usado para diagnosticar babesiose canina desde os anos 70 (Irwin 2010). A ocorrência de casos de reações cruzadas entre as várias espécies de *Babesia*, levaram a uma menor utilização do método. Um resultado positivo indica que houve exposição a *Babesia* spp., mas não identifica com precisão a espécie. Para além disso, alguns piroplasmas descritos recentemente poderão não ser detetados, o que também levou a uma diminuição da sensibilidade do diagnóstico (Irwin 2010; Solano-Gallego *et al.* 2016). Há ainda a possibilidade de haver falsos negativos em infeções agudas e hiperagudas. Como há um período de 3 a 4 semanas pós-infeção até à produção de anticorpos, há um período de janela em que há resultados serologicamente negativos, mas em que o animal está infetado. Assim, o animal deverá ser testado quando começaram a aparecer os sinais clínicos ou as alterações hematológicas, e deverá ser novamente retestado passadas 4 a 8 semanas (Solano-Gallego *et al.* 2016).

O uso de teste ELISA como método de diagnóstico de babesiose canina ainda não está estabelecido em contexto clínico, sendo usado em cenário de investigação e em inquéritos epidemiológicos (Solano-Gallego & Baneth 2011).

Esfregaço Sanguíneo

Quando os sinais clínicos são sugestivos de babesiose aguda ou hiperaguda, a observação do esfregaço sanguíneo ao microscópio é o método mais simples e acessível para o diagnóstico de *Babesia*. Na babesiose aguda a observação microscópica é um método bastante sensível na detecção do protozoário, se o esfregaço estiver bem feito e adequadamente corado. A *Babesia* pode aparecer sob diversas formas morfológicas, dependendo do esfregaço sanguíneo e da técnica usada. Deste modo, é importante saber diferenciar o parasita de artefactos e de detritos celulares (Irwin 2010).

A *Babesia* grande pode ser identificada como piroplasmas ovais, ovoides ou com a forma de peras, que podem aparecer sozinhos ou dispostos aos pares. Já a *Babesia* pequena aparece como anéis de sinete individuais ou múltiplos dentro dos eritrócitos. Em todas as espécies de *Babesia* o citoplasma fica transparente ou corado de azul, e o núcleo avermelhado (Valenciano *et al.* 2014).

A realização do esfregaço sanguíneo pode ser feita através da colheita de sangue de um capilar, como da orelha ou da unha, já que neste tipo de amostras há uma maior quantidade de parasitas, logo pode aumentar a sensibilidade do método de diagnóstico. Como os eritrócitos parasitados apresentam um tamanho superior ao normal, estes ficam acumulados em capilares, enquanto que em vasos de calibre superior movem-se mais facilmente (Paine 1934; Bohm *et al.* 2006; Solano-Gallego *et al.* 2016).

A visualização de um organismo de *Babesia* ao microscópio é o suficiente para confirmar o diagnóstico. Este método tem uma elevada especificidade, mas não é possível diferenciar entre as espécies, sendo apenas possível ver se é um organismo de grandes ou pequenas dimensões. As formas de *Babesia* grande são facilmente diagnosticadas, ainda que a *B. vogeli* seja a menos detetada, sendo preferível o uso de métodos moleculares para o diagnóstico desta espécie. Já as formas de *Babesia* pequena são difíceis de encontrar através da observação ao microscópio, pelo que a sensibilidade deste método é menor quando comparado com a observação de formas de *Babesia* grande. Assim, é recomendado a sua observação por um técnico experiente ou a realização de PCR. Para além disso, nos casos crónicos ou subclínicos, a sensibilidade do diagnóstico através da visualização do esfregaço sanguíneo é bastante baixa (Irwin 2010; Solano-Gallego *et al.* 2016).

Assim, a observação do esfregaço sanguíneo é considerada como o primeiro método a ser usado, sendo que os animais negativos devem ser submetidos a investigação por métodos

moleculares. Para além disso, nos casos positivos em que quisermos determinar a espécie, também devemos submeter a amostra a PCR. Esta sequência tem a vantagem de resolver o problema de falsos negativos da observação microscópica e de permitir determinar a espécie de *Babesia* (Solano-Gallego *et al.* 2016).

Esfregação de *Buffy-coat*

O uso de esfregaços de *buffy-coat* para diagnosticar infeções por *Babesia* pode facilitar o seu diagnóstico, já que alguns destes organismos parasitam preferencialmente os reticulócitos em relação aos eritrócitos maduros. Deste modo, como no esfregaço do *buffy-coat* está incluído a camada superior dos eritrócitos, vão aparecer reticulócitos e eritrócitos parasitados no esfregaço (Solano-Gallego & Baneth 2011). Esta técnica foi reportada pela primeira vez em 1963 em *Babesia caballi* (Irwin & Hutchinson 1991). Apesar de não haver muitos estudos sobre esta técnica, o seu uso foi considerado uma ajuda importante em baixas parasitémias, uma vez que a centrifugação do sangue levou à concentração dos eritrócitos parasitados (Irwin & Hutchinson 1991).

DIROFILÁRIA

A *Dirofilaria* foi, pela primeira vez, descrita no século XVII, quando Francesco Birago descreveu a presença de *Dirofilaria immitis* no coração dos seus cães. Atualmente, esta já foi diagnosticada em todo o mundo, exceto na Antártida (Schwan & Durand 2002; Simón *et al.* 2012; American Heartworm Society 2014).

A dirofilariose é causada por um nemátodo do género *Dirofilaria*, que é transmitida ao seu hospedeiro definitivo, o cão, através de vetores. Mais de 70 espécies de mosquitos podem funcionar como vetores, pertencendo todos à família *Culidae*. Apesar do cão ser o hospedeiro natural, têm vindo a aumentar o número de casos em gatos, humanos e outros animais, que funcionam como hospedeiros acidentais (Meireles *et al.* 2014; Marcos *et al.* 2016).

Etiologia e Distribuição geográfica

Dentro das espécies descritas de *Dirofilaria*, a *D. immitis* e a *D. repens* são as mais relevantes, devido à sintomatologia severa que causam e devido à sua elevada prevalência e incidência. A *D. immitis* é responsável por sintomatologia cardiopulmonar, enquanto que a *D. repens* provoca dirofilariose subcutânea (Simón *et al.* 2012).

As alterações climáticas, a urbanização e o aumento da mobilidade dos animais têm proporcionado um aumento do potencial de infeção e da prevalência de *Dirofilaria* no globo. Com

o aumento do número de mosquitos infetados, o número de animais infetados também tem vindo a aumentar (American Heartworm Society 2014). Aliás, estudos epidemiológicos indicam que a prevalência em mosquitos é menor do que nos hospedeiros vertebrados (Simón *et al.* 2012).

A temperatura e a humidade são condições essenciais para o ciclo de vida do vetor, para além de permitir o desenvolvimento das microfilárias nos mosquitos. Assim, no Inverno a transmissão de *Dirofilaria* diminui, uma vez que a maturação das larvas cessa abaixo dos 14°C. Com a chegada do calor, o seu desenvolvimento retoma, sendo que os meses de pico de transmissão de dirofilariose no Hemisfério Norte são os meses de Verão (julho e agosto) (American Heartworm Society 2014).

A distribuição geográfica de *D. immitis* é descrita em regiões temperadas e tropicais, estando distribuída por todo o mundo. Pelo contrário, *D. repens* está restrita a África, Europa e Ásia. De um modo geral, a dirofilariose tem vindo a aumentar na Europa, sendo as regiões do sul consideradas endémicas. Países anteriormente considerados não endémicos, principalmente no Norte da Europa, têm visto um aumento dos casos de dirofilariose, onde é mais comum a infeção por *D. repens*. Vários países europeus registam casos de ambas as espécies de *Dirofilaria*, como é o caso de Espanha (Simón *et al.* 2012; Meireles *et al.* 2014). Relativamente a Portugal, apenas foi descrito a presença de *D. immitis*, sendo a ilha da Madeira a região de Portugal com uma maior prevalência (30%) (Simón *et al.* 2012; Meireles *et al.* 2014; Ferreira *et al.* 2017). Para além disso, num estudo realizado por Cardoso *et al.* em 2012, em que se estudou a prevalência de *D. immitis* em animais aparentemente saudáveis e em animais suspeitos de estarem infetados por uma doença canina transmitida por vetores, verificou-se um nível de positividade de, respetivamente, 2,9% e 3,4% no Norte, 0,9% e 7,4% no Centro, 4,7% e 14,0% no Alentejo, 2,4% e 5,8% em Lisboa e de 5,1% e 17,1% no Algarve.

Ciclo de Vida

O ciclo de vida da *Dirofilaria immitis* dura, aproximadamente, seis a nove meses. Parte do desenvolvimento do nematode ocorre num hospedeiro invertebrado (hospedeiro intermediário obrigatório) e a outra parte num vertebrado (Meireles *et al.* 2014). O cão é considerado o hospedeiro definitivo para a dirofilariose, sendo o principal reservatório da infeção. Já os gatos, quando infetados, podem servir de fonte de infeção para os mosquitos durante os curtos períodos de microfilaremia (American Heartworm Society 2014).

Quando um culicídeo fêmea se alimenta do sangue de um animal infetado por *D. immitis*, ingere microfilárias que se encontravam na corrente sanguínea do animal. As microfilárias (L1)

migram para o intestino médio do mosquito e, em seguida, para os tubos de Malpighi. Aí, 10 dias após a infecção, mudam para o estágio de L2 e, cerca de 3 dias depois, sofrem uma nova metamorfose para L3 ou larva infetante. O número de dias pode variar conforme a temperatura e humidade. Em seguida, a L3 migra para a cabeça e aparelho bucal do mosquito, onde poderão ser transmitidas a um novo hospedeiro (American Heartworm Society 2014; Meireles *et al.* 2014).

Quando o mosquito se volta a alimentar, as larvas L3 são depositadas na pele do hospedeiro numa gota de hemolinfa (fluido que está nos vasos e na hemocele dos mosquitos). As larvas infetantes, já com diferenciação sexual, penetram no animal pela solução de continuidade presente devido à picada do mosquito. Aqui, migram para o tecido subcutâneo e para os músculos do tórax. A muda para L4 ocorre após infetarem o hospedeiro definitivo (começa no terceiro dia e termina 9 a 12 dias após a infecção) e a muda para L5 só ocorre entre os dias 50 e 70. Os adultos imaturos invadem o músculo e, eventualmente, as veias, sendo transportados para o coração e para o pulmão. A pressão do fluxo sanguíneo conduz o parasita para os vasos pulmonares. Devido ao seu comprimento, eles alojam-se nas grandes artérias pulmonares até se tornarem parasitas adultos. À medida que a parasitemia aumenta, os nemátodos passam das artérias lobares e da artéria pulmonar para o ventrículo direito, átrio e veia cava, interferindo com a função valvular e/ou com o fluxo sanguíneo. É ainda no estágio L5 que podem surgir migrações erráticas para, por exemplo, o sistema nervoso central. Passados 120 dias após infecção, os adultos tornam-se sexualmente maduros. Caso haja parasitas adultos de ambos os sexos, são produzidas novas microfíliarias, que vão para a circulação sanguínea (American Heartworm Society 2014; Meireles *et al.* 2014). Os parasitas adultos podem ficar no cão até 5 a 7 anos (Simón *et al.* 2012; Meireles *et al.* 2014) e as microfíliarias podem viver até 30 meses (Hoch & Strickland 2008). O ciclo de vida da *D. immitis* encontra-se esquematizado na figura 5.

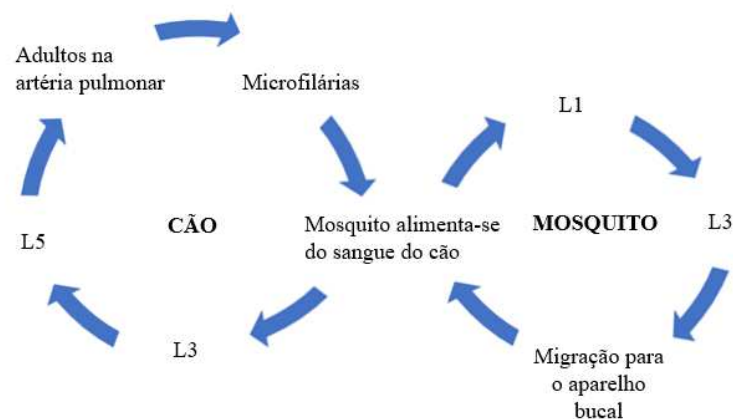


Figura 5: Esquematização do ciclo de vida da *Dirofilaria immitis*.

Sintomatologia e Alterações hematológicas e bioquímicas

A maioria dos animais infetados com *Dirofilaria immitis* não apresenta qualquer sintomatologia. Nestes casos, o diagnóstico é normalmente um achado. Quando o animal apresenta sintomatologia clínica, esta está relacionada com o tempo de curso da infeção, com a severidade da doença causada pelas larvas e substâncias vasoativas libertadas, com a carga parasitária e com a reação do hospedeiro à presença de *Dirofilaria* (Hoch & Strickland 2008; Meireles *et al.* 2014).

Normalmente, os sinais clínicos refletem a presença dos nematodes nas artérias e no pulmão. Assim, as larvas L5 podem causar lesões vasculares, como lesões do endotélio e aumento de vasos tortuosos, assim como lesões pulmonares, como pneumonia eosinofílica e hipertensão pulmonar. Esta hipertensão leva a uma hipertrofia excêntrica que, por sua vez, culmina em insuficiência cardíaca congestiva acompanhada de ascite e edema periférico. Em situações em que há uma grande carga parasitária, com alojamento no ventrículo direito do hospedeiro, poderá existir regurgitação da tricúspide, diminuição do fluxo sanguíneo e sintomatologia de insuficiência cardíaca direita. Esta insuficiência resulta em hepatomegalia e diminuição do débito cardíaco. Poderá também ocorrer anemia hemolítica, com hemólise intravascular devido à destruição dos eritrócitos quando passam pelas larvas. Para além disso, as larvas mortas acumuladas nos vasos, podem causar sérias lesões como trombose e inflamação granulomatosa perivascular (Hoch & Strickland 2008; Meireles *et al.* 2014).

A dirofilariose também pode levar a lesões renais causadas pela deposição de complexos antígeno-anticorpo. Porém, raramente causa insuficiência renal. Dependendo da existência da migração aberrante de larvas, pode acompanhar-se de sintomatologia neurológica, oftalmológica, entre outros quadros (Hoch & Strickland 2008).

As alterações hematológicas e bioquímicas não são específicas e nem sempre estão presentes. Relativamente ao hemograma, pode-se observar uma anemia, ligeira a moderada, causada pela hemólise intravascular, sendo normalmente normocítica e normocrómica. A anemia é mais grave quando já há microfilárias na circulação sanguínea. Para além disso, alguns animais apresentam trombocitopenias ligeiras devido a uma destruição imuno-mediada das plaquetas ou a uma vasculite severa. O número de eosinófilos e de basófilos também podem estar aumentados (Oliveira *et al.* 2013). Os basófilos não podem ser avaliados nas máquinas de hemograma, pelo que têm de ser avaliados no esfregaço sanguíneo (Weiss & Tvedten 2012). Relativamente aos valores bioquímicos, reporta-se um possível aumento na concentração de ureia, creatinina e fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina poderá estar aumentada devido à lesão hepática e dos ductos biliares e a creatinina devido a lesões glomerulares extensas (Oliveira *et al.* 2013).

Métodos de Diagnóstico

Atualmente, existem testes de detecção de antígeno circulante, que detetam proteínas secretadas pelas fêmeas adultas de *D. immitis* e testes de pesquisa de microfilárias no sangue periférico. Destes últimos, os que concentram as microfilárias circulantes, apresentam uma maior sensibilidade: teste de filtração modificado de Knott (American Heartworm Society 2014) e esfregaço de *buffy-coat* (Marcos *et al.* 2016). Assim, é recomendado a realização de testes de detecção de antígenos juntamente com testes de pesquisas de microfilárias (American Heartworm Society 2014).

A presença de antígenos precede a presença de microfilárias, sendo que o diagnóstico poderá ser feito a partir dos 5 meses por detecção serológica e a partir dos 6 meses por pesquisa de hemoparasitas (American Heartworm Society 2014).

Para além do teste modificado de Knott e do esfregaço de *buffy-coat*, a observação de microfilárias ainda é possível no esfregaço sanguíneo e através do teste de filtração. Relativamente a outros métodos usados, podem ainda realizar-se métodos moleculares. Para além disso, o uso de radiografias torácicas e de ecocardiografias podem ajudar a confirmar o diagnóstico e a avaliar a gravidade da doença (American Heartworm Society 2014; Marcos *et al.* 2016).

Detecção Molecular

Os métodos de diagnóstico moleculares permitem identificar e discriminar as espécies de *Dirofilaria*. Assim, o PCR é considerado uma técnica de elevada sensibilidade e especificidade. Reações positivas já foram obtidas através de amostras de sangue, de pele e em mosquitos, mesmo quando há quantidades mínimas do DNA do parasita (Simón *et al.* 2012; Silbermayr *et al.* 2014).

Detecção Serológica

Os testes de detecção de antígeno circulante disponíveis são o teste imunoenzimático (ELISA) e ensaios imunocromatográficos. Estes testes, para além de terem uma maior sensibilidade do que os testes de detecção de microfilárias, permitem diagnosticar a presença de *Dirofilaria* sem que haja ainda microfilárias circulantes, tendo uma especificidade próxima dos 100%, desde que haja, pelo menos, um nematode fêmea maduro (American Heartworm Society 2014; Meireles *et al.* 2014).

A detecção serológica deteta proteínas provenientes do útero das fêmeas adultas de *D. immitis* (Meireles *et al.* 2014). Assim, quando há infeções em que apenas se encontram machos adultos, estes testes não os serão capazes de detetar. Para além disso, há outros casos que poderão

levar ao aparecimento de falsos negativos, como quando são formados complexos antígeno-anticorpo. Quando há baixas cargas parasitárias e/ou antigenemia ou quando a infecção envolve fêmeas imaturas, também podem comprometer a sensibilidade do teste. O correto funcionamento do kit implica que se siga corretamente as instruções, para diminuir as ocorrências de falsos positivos e negativos. Devido a estas situações que podem levar a falsos negativos, os resultados dos testes deverão ser registados como positivos ou ausência de antígeno circulante, não devendo ser considerados como negativos (American Heartworm Society 2014).

Nos testes de ELISA não podemos correlacionar a intensidade da cor de um resultado positivo com a carga parasitária. Apesar da quantidade de antígenos circulantes estar relacionada com o número de fêmeas maduras de *D. immitis*, esta relação é imprecisa. O aumento transitório dos antígenos no sangue, associados à morte recente dos nematodes, e a baixa antigenemia presente em infecções com fêmeas adultas jovens ou com baixa carga parasitária de fêmeas, interferem com a avaliação do nível da carga parasitária (American Heartworm Society 2014).

O método de ELISA permite ainda determinar a eficácia da terapêutica adulticida. A concentração dos antígenos baixa para níveis indetectáveis após 8 a 12 semanas de tratamento. Porém, se os níveis de antígeno não baixarem, só se pode considerar o tratamento ineficaz passados 6 meses após o início do tratamento (Meireles *et al.* 2014).

Pesquisa de microfilárias

Os testes de pesquisa de microfilárias podem não ser tão sensíveis como os testes serológicos, mas permitem a confirmação do diagnóstico serológico e o diagnóstico de dirofilariose em casos de falsos negativos, quando já há microfilárias na corrente sanguínea. Para além disso, permitem a identificação de animais que servem de reservatório e a contagem dos nematodes. Esta contagem é bastante importante porque a administração de alguns microfilaricidas pode ocasionar reações graves quando há elevada carga parasitária (American Heartworm Society 2014; Marcos *et al.* 2016). Porém, estes testes apenas permitem o diagnóstico de dirofilariose em cães com microfilaremia. Os cães podem não ter microfilárias em circulação quando a infecção consiste em nemátodes de um só sexo, quando ainda estão no período de pré-patência e quando há a destruição de microfilárias por ação de fármacos. Para além disso, não se pode determinar a severidade da infecção, uma vez que não há nenhuma relação entre o número de microfilárias e de nematodes adultos no cão (Meireles *et al.* 2014).

A morfologia das microfilárias também pode ser observada, o que permitirá diferenciar as espécies de microfilária. As microfilárias de *D. immitis* são mais curtas do que as *D. repens*. A

extremidade anterior da *D. immitis* tem uma forma cônica e a extremidade posterior é alongada. Pelo contrário, na *D. repens* a extremidade anterior é arredondada e a posterior é em gancho. Para além disso, a utilização de coloração por fosfatase ácida, também poderá ajudar na diferenciação entre as microfilárias. Assim, na *D. immitis* fica marcado o poro excretor e anal, enquanto na *D. repens* só é marcado o poro anal (Meireles *et al.* 2014). Por fim, ainda se pode comparar o espaço cefálico, sendo que o da *D. immitis* é maior e não tem um par de núcleos distintos separado dos restantes núcleos somáticos, ao contrário da *D. repens* (Liotta *et al.* 2013).

Teste Modificado de Knott

O teste modificado de Knott é considerado um método de elevada sensibilidade e especificidade, para além de ser o método recomendado para a observação da morfologia, para medir as dimensões das microfilárias e determinar a espécie de *Dirofilaria* (American Heartworm Society 2014; Marcos *et al.* 2016).

Para realizar este teste coloca-se 1 mL de sangue em EDTA com 9 mL de formalina a 2% num tubo de centrifuga. A mistura, através da inversão repetida do tubo permite a lise dos eritrócitos. Em seguida, o tubo centrifugado a 1100 a 1500 rpm durante 5 a 8 minutos. O sedimento é colocado numa lâmina com uma gota de azul de metileno e coberto com uma lamela. A pesquisa de microfilárias é realizada numa ampliação de 100x, mas para se estudar as características da microfilária é necessária uma ampliação de 400x (American Heartworm Society 2014).

Teste de Filtração

O teste de filtração é um método semelhante ao teste modificado de Knott, exceto que o sangue passa por um filtro que retém as microfilárias. Os kits comerciais contêm um detergente que provoca a lise dos eritrócitos e uma coloração diferencial. Este método é mais fácil que o teste modificado de Knott, mas as características morfológicas das microfilárias não são tão óbvias (Sirois 2017).

Esfregaço Sanguíneo

Também se pode detetar a sua presença através de um esfregaço sanguíneo. Este método não permite a concentração das microfilárias em circulação, pelo que, dentro dos métodos de pesquisa de microfilárias, é considerado o menos sensível (American Heartworm Society 2014; Meireles *et al.* 2014).

Utilização do *buffy-coat*

Inicialmente, foram usados tubos de microhematócrito intactos para visualizar a movimentação de microfilárias entre o *buffy-coat* e o plasma. No entanto, este método tem muito baixa sensibilidade quando há um baixo número de microfilárias em circulação (American Heartworm Society 2014; Meireles *et al.* 2014). Para além disso, este procedimento não permite a identificação da espécie nem avaliar a morfologia das microfilárias (Marcos *et al.* 2016).

O uso do esfregaço de *buffy-coat* mostrou ser, noutros estudos, tão sensível quando comparado com o teste modificado de Knott para deteção de microfilárias. Para além disso, este método permite também pesquisar outros parasitas, necessitando de uma menor quantidade de sangue e não requer o uso de formalina (Mylonakis *et al.* 2004; Marcos *et al.* 2016).

OBJETIVOS

O trabalho realizado durante os quatro meses de estágio teve como objetivo comparar o esfregaço de sangue periférico com o de *buffy-coat*, para a deteção de hemoparasitas. Assim, procurou-se detetar, quantificar e comparar a morfologia dos organismos em ambos os métodos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Durante o período do estágio foi realizado um estudo comparativo do esfregaço sanguíneo e do *buffy-coat* como métodos de diagnóstico de hemoparasitas. Estes esfregaços foram realizados durante os meses de fevereiro, março e início de abril de 2017, em animais suspeitos ou com alterações sugestivas de existência de hemoparasitas no hemograma e que foram sujeitos a avaliações hematológicas no laboratório Segalab. Já a avaliação das lâminas com hemoparasitas foi realizada em abril e maio de 2017 no ICBAS.

Os esfregaços de sangue foram realizados segundo a técnica convencional, enquanto os esfregaços de *buffy-coat* foram obtidos após centrifugar os tubos de microhematócrito a 15000 rpm durante 5 minutos. Depois, os tubos foram cortados entre o *buffy-coat* e o plasma, usando uma caneta de diamante. Depois de cortados, com a ajuda de um clip, o *buffy-coat*, com uma gota de plasma e uma pequena parte da camada superior dos eritrócitos, foi colocado numa lâmina, onde se fez o esfregaço. Em seguida, os esfregaços foram secos ao ar.

Para corar os esfregaços sanguíneos e os de *buffy-coat*, utilizou-se a coloração de Wright. Assim, cobriram-se as lâminas com 1 mL de solução de Wright durante 4 minutos. Em seguida, acrescentou-se, aproximadamente, 2 mL de água destilada sobre a lâmina, durante 10 minutos. Por fim, lavou-se a lâmina com água corrente e deixou-se secar ao ar.

Depois de coradas, as lâminas foram montadas e observadas ao microscópio ótico, onde cada lâmina foi avaliada durante 15 a 20 minutos para a pesquisa de hemoparasitas. No caso dos esfregaços sanguíneos, deu-se uma maior importância à pesquisa de hemoparasitas na cauda do esfregaço. Primeiramente, a lâmina foi avaliada em baixa ampliação para a procura de microfilárias. Em seguida, fez-se uma avaliação, com uma ampliação de 400x à procura de outros parasitas, tendo-se aumentado a ampliação para 1000x nos locais de suspeita da presença de hemoparasitas. A pesquisa foi depois realizada em grande ampliação durante o resto do tempo de avaliação do esfregaço, tendo sido possível a avaliação de toda a cauda do esfregaço e de um número mínimo de 100 campos por lâmina. Esta avaliação também permitiu identificar e avaliar a morfologia dos hemoparasitas, quando encontrados.

A contagem do número de parasitas encontrados nos esfregaços dependeu do organismo encontrado. No caso de *Dirofilaria*, foram contadas todas as microfilárias da lâmina enquanto nas formas de *Babesia*, foram quantificados os protozoários em 10 campos de grande ampliação. Esta contagem foi realizada em 10 campos consecutivos na cauda do esfregaço sanguíneo, já que esta é a zona onde se descreve maior concentração de hemoparasitas. No esfregaço de *buffy-coat* foram também escolhidos 10 campos consecutivos semelhantes aos campos do esfregaço sanguíneo observados, em termos do número de eritrócitos presentes.

A contagem dos hemoparasitas entre os dois métodos foi, posteriormente, submetida a análise estatística através dos softwares IBM SPSS Statistics (SPSS 2013) para efetuar os cálculos e Minitab (Minitab 2010) para desenhar os gráficos.

RESULTADOS

Foram observados esfregaços sanguíneos e de *buffy-coat* de 100 animais, 23 gatos e 77 cães. Nesta população, apenas se detetou a presença de organismos de *Babesia* e microfilárias. O número de animais parasitados em ambos os métodos foi o mesmo, sendo que 14 cães tinham *Babesia* e 4 tinham *Dirofilaria* (Tabela 1). A caracterização da amostra encontra-se detalhada no Anexo II.

A		<i>Buffy-coat</i>	
		+	-
Esfregaço sanguíneo	+	14	0
	-	0	86

B		<i>Buffy-coat</i>	
		+	-
Esfregaço sanguíneo	+	4	0
	-	0	96

Tabela 1: A: Comparação entre o esfregaço sanguíneo e de *buffy-coat* na deteção de *Babesia* na população em estudo. B: Comparação entre o esfregaço sanguíneo e de *buffy-coat* na deteção de microfilárias na população em estudo.

Nos casos positivos fez-se uma contagem do número de hemoparasitas observados por cada método. Nas tabelas 2 e 3 estão representados os valores obtidos, e na tabela 4 a mediana das contagens para cada método.

Número	Referência	Espécie	Hemoparasita	Contagem no esfregaço sanguíneo	Contagem no Buffy-Coat
1	8754-G2	Canídeo	<i>Dirofilaria immitis</i>	13	1
2	8763-D10	Canídeo	<i>Dirofilaria immitis</i>	135	189
3	8718-B6	Canídeo	<i>Dirofilaria immitis</i>	6	7
4	8776-F7	Canídeo	<i>Dirofilaria immitis</i>	233	435

Tabela 2: Contagem do número de *Dirofilaria immitis* presente no esfregaço sanguíneo e de *buffy-coat*.

Número	Referência	Espécie	Hemoparasita	Contagem no esfregaço sanguíneo	Contagem no Buffy-Coat
5	8782-G6	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	30	51
6	8732-G5	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	69	941
7	8754-H10	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	11	38
8	8769-G8	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	2	4
9	8764-E7	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	25	124
10	8765-C10	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	14	26
11	8770-A2	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	33	23
12	8771-F10	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	10	3
13	8777-B5	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	3	13
14	8783-F12	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	8	8
15	8783-B9	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	66	143
16	8782-G9	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	3	9
17	8707-G1	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	5	27
18	8718-H4	Canídeo	<i>Babesia</i> spp.	4	4

Tabela 3: Contagem do número de *Babesia* spp. presente no esfregaço sanguíneo e de *buffy-coat* em 10 campos de grande ampliação.

Hemoparasita	Mediana da contagem no esfregaço sanguíneo	Mediana da contagem no esfregaço de <i>Buffy-coat</i>
<i>Dirofilaria immitis</i>	74 (6 – 233)	98 (1 – 435)
<i>Babesia</i> spp.	10,5 (2 – 69)	24,5 (3 – 941)

Tabela 4: Mediana (intervalo) das contagens dos hemoparasitas no esfregaço sanguíneo e no esfregaço de *buffy-coat*

Estes resultados foram analisados estatisticamente. Relativamente à *Dirofilaria immitis*, só quatro amostras foram positivas. Assim, a amostra é demasiado pequena para se fazer inferência estatística, limitando-se as conclusões à análise descritiva dos valores observados. As contagens obtidas no *buffy-coat* e no esfregaço sanguíneo encontram-se representadas no gráfico 1, sendo que no *buffy-coat* as contagens foram superiores em três observações e inferior num caso.

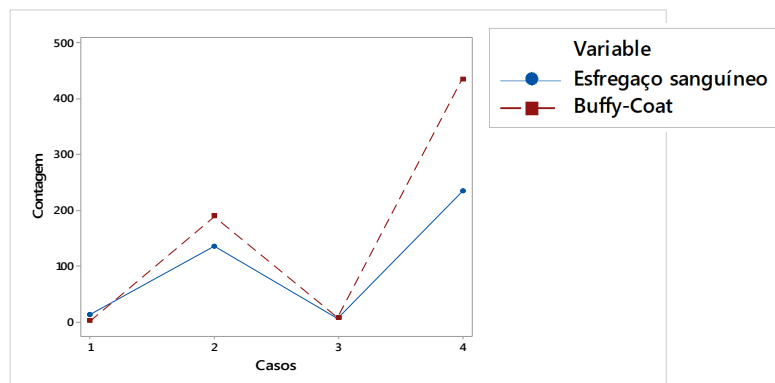


Gráfico 1: Valores da contagem no esfregaço de *buffy-coat* versus contagem no esfregaço sanguíneo para o hemoparasita *Dirofilaria immitis*.

Para o hemoparasita *Babesia* spp., catorze casos foram positivos. As contagens obtidas no esfregaço de *buffy-coat* foram superiores em dez observações e inferiores em duas, relativamente ao método no esfregaço sanguíneo, tendo-se ainda observado valores idênticos em dois casos.

Uma vez que os dados não seguiam uma distribuição normal e não existia uma simetria das diferenças de valores observados, o teste de Wilcoxon (*Wilcoxon matched-pair signed-rank*) não foi usado. Assim, recorreu-se ao teste dos sinais, que não toma em consideração os valores das diferenças, como no teste de Wilcoxon, mas apenas o seu sinal (positivo ou negativo), para testar se a mediana é nula. O valor de prova obtido, utilizando a distribuição binomial, para a hipótese nula da mediana das diferenças ser igual a zero, foi de $p = 0,039$. Assim, o resultado é estatisticamente significativo para um nível de significância de 5%.

É interessante notar que o intervalo de confiança estimado (Hodges–Lehmann a 95%) para a mediana das diferenças entre os dois métodos, variou entre 0,3 a 5,45. Ou seja, a mediana das contagens no *buffy-coat* supera a mediana das contagens no esfregaço sanguíneo em 0,3 a 5,45 parasitas, com 95% de certeza.

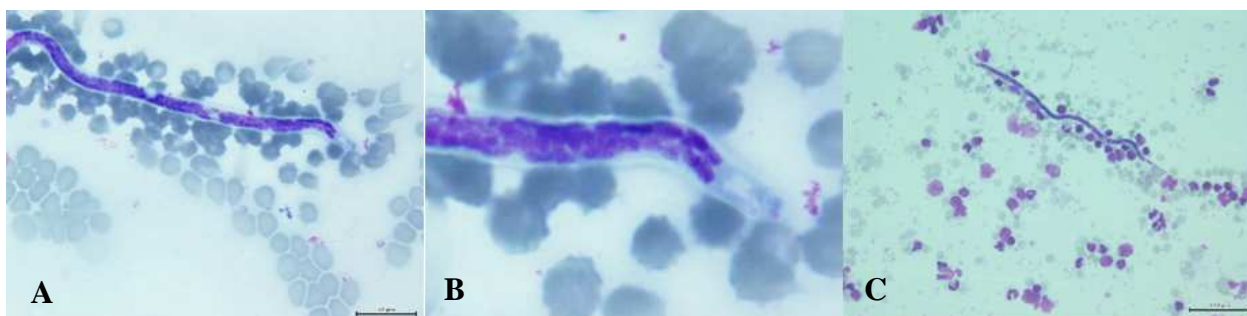


Figura 6: Microfilária de *Dirofilaria immitis* no esfregaço sanguíneo (A), com ampliação da cavidade cefálica, que permite observar uma zona grande não corada característica desta espécie (B). No esfregaço de *buffy-coat* a morfologia das microfilárias era idêntica (C).

Relativamente à *Babesia*, foi possível observar que se tratavam de formas de *Babesia* grande, mas não houve confirmação da espécie, uma vez que não se fez PCR. No esfregaço sanguíneo, verificou-se a presença de organismos com formas variadas, desde piriformes a redondos, até formas irregulares, com citoplasma transparente e com um núcleo vermelho pouco evidente. Para além disso, não se encontraram protozoários extra-eritrocitários e era comum o aparecimento de mais do que uma *Babesia* por eritrócito; o máximo que se observou foi um eritrócito com 8 organismos de *Babesia*. Já no esfregaço de *buffy-coat*, observou-se uma grande quantidade de *Babesia* nos eritrócitos, bem como formas livres no fundo do esfregaço. Ao contrário do que acontecia no esfregaço sanguíneo, estes organismos tinham uma morfologia bem mais uniforme, sendo normalmente piriformes ou redondos, com um citoplasma azul e um núcleo vermelho mais evidente. Relativamente ao número máximo de organismos de *Babesia*, foram observados até 6 organismos por eritrócito.

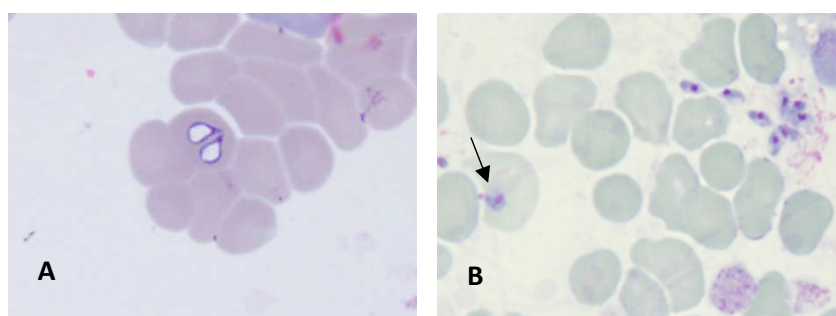


Figura 7: A: Observação de duas formas de *Babesia* grande dentro de um eritrócito no esfregaço sanguíneo. B: Observação de formas de *Babesia* livres no esfregaço de *buffy-coat* e de um organismo dentro de um eritrócito (seta).

DISCUSSÃO

Neste estudo avaliou-se a presença de hemoparasitas em esfregaços sanguíneos e de *buffy-coat* em 100 animais. Nestes, apenas se identificou a presença de formas de *Babesia* e microfilárias, que são dos hemoparasitas mais frequentemente reportados em Portugal (Meireles *et al.* 2014; Solano-Gallego *et al.* 2016).

Numa primeira análise quando se compara o esfregaço sanguíneo com o de *buffy-coat*, verifica-se que foram diagnosticados os mesmos casos, parecendo, por isso, haver uma sensibilidade semelhante. No entanto, a quantidade de casos positivos é muito baixa para se poder tirar qualquer conclusão neste sentido. Seria necessário aumentar a casuística de observação, o que não foi possível neste trabalho pelas limitações temporais. Ainda assim, o esfregaço de *buffy-coat* parece mostrar um número maior de hemoparasitas, tal como era esperado para a *Dirofilaria* (American Heartworm Society 2014; Marcos *et al.* 2016). Relativamente à *Babesia*, poucos

estudos avaliaram a utilidade do esfregaço de *buffy-coat* para o diagnóstico deste hemoparasita (Irwin & Hutchinson 1991). A única conclusão obtida era que havia uma maior concentração de *Babesia*, não podendo ser tiradas nenhuma conclusão sobre a sensibilidade do método.

Nos animais positivos para *Dirofilaria*, verificou-se uma maior concentração de microfilárias no esfregaço de *buffy-coat* do que no esfregaço sanguíneo em três dos quatro animais, o que está de acordo com a bibliografia (Mylonakis *et al.* 2004). Como no esfregaço de *buffy-coat* há uma concentração das microfilárias devido à centrifugação do sangue, o número de organismos será maior neste método do que com o esfregaço sanguíneo (American Heartworm Society 2014; Marcos *et al.* 2016). Relativamente à amostra 1 (maior número de microfilárias no esfregaço sanguíneo), pode ter havido um erro técnico no corte e realização do esfregaço de *buffy-coat*, ou outra falha técnica poderá explicar o observado. De facto, se o tubo de microhematócrito for cortado demasiado no interior da camada do *buffy-coat*, poderá não se usar a zona de interface *buffy-coat*/plasma, o que poderá explicar a presença duma única microfilária. Segundo a bibliografia, este parasita fica concentrado na interface *buffy-coat*/plasma (Sirois 2017).

Nos animais positivos para *Babesia*, foram encontrados mais protozoários por campo de grande ampliação no esfregaço de *buffy-coat* do que no esfregaço sanguíneo em dez dos catorze casos. Este resultado foi considerado estatisticamente significativo, segundo a análise realizada. Assim, existem evidências moderadas de que o valor mediano pelo método do *buffy-coat* é superior ao valor mediano do esfregaço sanguíneo. No entanto, não se pode valorizar de forma excessiva os resultados obtidos face à reduzida dimensão da amostra; seria relevante aumentar o número de casos positivos.

Nos animais com *Babesia* foi possível observar que em animais com maior a carga parasitária, havia um aumento da contagem no esfregaço de *buffy-coat*, com a exceção dum caso (caso 11), em que se encontrou um menor número de hemoparasitas no esfregaço de *buffy-coat*, quando comparado com o esfregaço sanguíneo. Ainda assim, em animais com baixas cargas parasitárias, observou-se um maior número no esfregaço de *buffy-coat*, na maioria dos casos, o que está de acordo com a bibliografia (Irwin & Hutchinson 1991). Assim, o esfregaço de *buffy-coat* poderá ser principalmente importante quando o número de parasitas for baixo.

Relativamente à morfologia, e para a *Dirofilaria*, as características das suas microfilárias eram idênticas em ambos os métodos, como descrito na bibliografia (Marcos *et al.* 2016). De acordo com a morfologia observada, as microfilárias foram relacionadas com a espécie *D. immitis*. Isto era esperado, já que em Portugal não existem casos de *D. repens* reportados (Ferreira *et al.* 2017).

Já quanto à morfologia das formas de *Babesia*, observou-se diferenças na morfologia dos organismos entre os dois métodos. A presença de organismos livres no fundo do esfregaço de *buffy-coat* é um dado novo, que ainda não tinha sido reportado. Esta poderá ser devida à centrifugação, que poderá levar à lise de eritrócitos, sendo que os eritrócitos parasitados poderão estar mais fragilizados (Solano-Gallego & Baneth 2011). Para além disso, se tiver havido um maior intervalo de tempo entre a colheita de sangue e a sua centrifugação (o que tende a ocorrer nas amostras de *buffy-coat*), pode levar a um aumento da hemólise (Yu *et al.* 2010). Ainda assim, a presença de formas livres pode não se dever a questões técnicas. Durante o ciclo de vida da *Babesia*, há um período em que os merozoítos se encontram livres na corrente sanguínea, depois de destruírem o eritrócito em que estavam e antes de invadir o próximo eritrócito (Irwin 2010). Assim, estes merozoítos que se encontram livres no sangue, poderão ser concentrados na interface *buffy-coat*/plasma durante a centrifugação, tal como acontece nas microfilárias. Isto explicaria, em parte, a maior concentração de *Babesia* extra-eritrocitária nos esfregaços de *buffy-coat*. Eventualmente, a explicação deste fenómeno poderá residir numa combinação de ambos os fatores e não apenas um. Porém, será necessário fazer mais estudos para averiguar se a presença extra-eritrocitária é uma constante nos esfregaços de *buffy-coat*.

Nos animais com babesiose foram encontradas formas de *Babesia* grande, o que seria de esperar de acordo com a bibliografia, uma vez que as formas de *B. canis* e a *B. vogeli* são as mais reportadas em Portugal (Cardoso *et al.* 2008). Relativamente ao número máximo de organismos de *Babesia* spp. encontrados num eritrócito, não parece haver uma relação entre este número e o método utilizado. O número máximo de formas encontradas por eritrócito (6 a 8) também se encontra de acordo com a bibliografia (Solano-Gallego & Baneth 2011).

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos indicam que o esfregaço de *buffy-coat* poderá ser um método importante para o diagnóstico de hemoparasitas, já que permite observar um maior número de organismos por campo, tornando mais rápido e fácil o diagnóstico. Aliás, em laboratórios com uma elevada casuística, não é possível perder 15 a 20 minutos por esfregaço sanguíneo na procura de hemoparasitas. Por isso, a existência de um método de diagnóstico simples e com um tempo de diagnóstico menor, poderá levar a um aumento do número de casos diagnosticados. Ainda assim, o número de casos positivos deverá ser maior, para se poder tirar conclusões mais seguras relativamente a estes dois métodos.

O presente estudo teve algumas limitações, devido principalmente ao período de amostragem, que não permitiu ter uma quantidade de animais parasitados suficientemente grande para se poder tirar ilações estatisticamente relevantes. De facto, é na Primavera e no Outono em que são reportados um maior número de casos de *Babesia* e é no Verão que há mais *Dirofilaria*. Neste caso, o estudo foi realizado no Inverno e no início da Primavera. Uma outra limitação prende-se com o facto de não ter sido possível realizar a confirmação dos casos por PCR, não sendo possível confirmar a espécie do parasita. Ainda uma outra limitação está relacionada com a não inclusão de animais com serologia ou PCR positivos, mas com observação negativa no esfregaço sanguíneo.

Como perspetivas futuras, pensa-se que seria importante continuar com o estudo, de modo a se ter uma maior amostragem de casos positivos, para se poder confirmar (ou não) a tendência que estes resultados indicam. Para além disso, como há muito poucos estudos sobre o uso de esfregaço de *buffy-coat* como método de diagnóstico de *Babesia*, seria interessante realizar esfregaços sanguíneos e de *buffy-coat* em todos os animais com babesiose confirmados por PCR ou serologia. Assim, seria possível avaliar melhor a sensibilidade destes métodos. Seria ainda importante realizar um estudo que relacionasse a densidade parasitária com a severidade da doença em *Babesia canis*, de modo a perceber se a contagem do número de organismos encontrados poderá ser importante para o prognóstico. Seria igualmente interessante relacionar a densidade parasitária com a sensibilidade diagnóstica dos dois métodos (esfregaço sanguíneo e *buffy-coat*).

BIBLIOGRAFIA

- Adanir R, Sezer K, Kose O (2013) “The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs with different breed, ages and sex” **Ankara Üniv Vet Fak Derg** 60, 241-244
- Ahmed NH, Samantaray JC (2014) “Quantitative Buffy Coat Analysis-An Effective Tool for Diagnosing Blood Parasites” **Journal of Clinical & Diagnostic Research** 8, DH01
- American Heartworm Society (2014) “Orientações atuais para Prevenção, Diagnóstico e Controle de Dirofilariose (*Dirofilaria immitis*) em cães” **American Heartworm Society**. Acedido em 9 de junho de 2017, disponível em: https://www.heartwormsociety.org/images/documents/2014_AHS_Canine_Guidelines.Portuguese.Pesquisável.pdf
- Bohm M, Leisewitz AL, Thompson PN, Schoeman JP (2006) “Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise” **Veterinary Parasitology** 141, 18-29
- Cardoso L, Costa A, Tuna J, Vieira L, Eyal O, Yisaschar-Mekuzaz Y, Baneth G (2008) “*Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal” **Veterinary Parasitology** 156, 199-204
- Cardoso L, Mendão C, Madeira de Carvalho L (2012) “Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal – a national serological study” **Parasites & Vectors** 5, 62

- Caprariis D, Dantas-Torres F, Capelli G, Mencke N, Stanneck D, Breitschwerdt EB, Otranto D (2011) “Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens” **Veterinary Microbiology** 149, 206-212
- Dantas-Torres F, Figueredo LA (2006) “Canine babesiosis: A Brazilian perspective” **Veterinary Parasitology** 141, 197-203
- Ferreira C, Afonso A, Calado M, Maurício I, Alho AM, Meireles J, Carvalho LM, Belo S (2017) “Molecular characterization of *Dirofilaria* spp. circulating in Portugal” **Parasites & Vectors** 10, 250
- Garrett LD, Craig CL, Szladovits B, Chun R (2007) “Evaluation of buffy coat smears for circulating mast cells in healthy cats and ill cats without mast cell tumor-related disease” **Journal of the American Veterinary Medical Association** 231, 1685-1687
- Goddard A, Leisewitz AL, Kristensen AT, Schoeman JP (2015) “Platelet indices in dogs with *Babesia rossi* infection” **Veterinary Clinical Pathology** 44/4, 493-497
- Harvey JW (2012) “Hematology Procedures” in Harvey JW (Ed.) **Veterinary Hematology: Diagnostic Guide and Color Atlas**, 1^o Ed, Elsevier, 11-32
- Hoch H, Strickland K (2008) “Canine and Feline Dirofilariasis: Life Cycle, Pathophysiology and Diagnosis” **Compendium of Continuing Education Vet** 30, 133-141
- Irwin PJ, Hutchinson GW (1991) “Clinical and pathological findings of Babesia infection in dogs” **Australian Veterinary Journal** 68, 204-209
- Irwin PJ (2009) “Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control” **Parasites & Vectors** 2, S4
- Irwin PJ (2010) “Canine Babesiosis” **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 40, 1141-1156
- Kirtz G, Leschnik M, Hooijberg E, Tichy A, Leidinger E (2012) “In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (*Babesia canis canis*) for veterinary practitioners in Central Europe” **Tierärztliche Praxis Kleintiere** 2, 87-94
- Liotta JL, Sandhu GK, Rishniw M, Bowman DD (2013) “Differentiation of the microfilariae of *Dirofilaria immitis* and *Didofilaria repens* in stained blood films” **The Journal of Parasitology** 99, 421-425
- Marcos R, Pereira C, Santos M, Luzzago C, Lauzi S, Maia JP, Faustino A, Puente-Payo P (2016) “Buffy coat smear or Knott’s test: which to choose for canine microfilaria screening in field studies?” **Veterinary Clinical Pathology** 45, 201-205
- Meireles J, Paulos F, Serrão I (2014) “Dirofilariose canina e felina” **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** 109, 70-78
- Mylonakis ME, Papadopoulos E, Koutinas AF, Paitaki C, Leontides L (2004) “Comparative methodology for the detection and differentiation of circulating microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog.” **Journal of Helminthology** 78, 137-140
- Oliveira INV, Moreira HR, Fazio-Junior PI, Castro LRS, Trindade CED, Bezerra DKO, Madeira EAO, Almeida B, Fernandes JI (2013) “Perfil hematológico e bioquímico de cães infectados por *Dirofilaria immitis* da localidade da ilha de Algodão, Pará” **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 35, 74-80
- Otranto D, Dantas-Torres F (2010) “Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives” **Parasites & Vectors** 3:2
- Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt EB (2009) “Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one” **Trends in Parasitology** 25, 157-163

- Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Stanneck D, Decapariis D, Capelli G, Baneth G (2011) "Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR" **Parasites & Vectors** 4:55
- Paine R (1934) "An observation on the preparation of blood smears for the diagnosis of piroplasmosis" **Journal of the South African Veterinary Association** 5, 127
- Palmer GH (2002) "Babesiosis" **Encyclopedia of Life Sciences**, 1-8
- Rosenfeld AJ, Dial SM (2010) **Clinical Pathology for the Veterinary Team** 1° Ed, Wiley-Blackwell, pp 296
- Salam MA, Khan MM, Askar KRH, Afrad MH, Huda MM, Mondal D (2012) "Peripheral Blood Buffy Coat Smear: a promising Tool for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis" **Journal of Clinical Microbiology** 50, 837-80
- Schwan EV, Durand DT (2002) "Canine filariosis by *Dirofilaria immitis* in Mozambique: a small survey based on the identification of microfilariae" **Journal of the South African Veterinary Association** 73, 124-126
- Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB (2001) "Tick-borne infectious diseases of dogs" **Trends in Parasitology** 17, 74-80
- Silbermayr K, Eigner B, Duscher GG, Joachim A, Fuerhrer H (2014) "The detection of different *Dirofilaria* species using direct PCR technique" **Parasitology Research** 113, 512-516
- Simões PB, Cardoso L, Araújo M, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G (2011) "Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs – first report from Portugal and possible vertical transmission" **Parasites & Vectors** 4, 50
- Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, Montoya-Alonso JA (2012) "Human and Animal *Dirofilariasis*: the Emergence of a Zoonotic Mosaic" **Clinical Microbiology Reviews** 25, 507-544
- Sirois M (2017) **Principles and Practice of Veterinary Technology**, 4° Ed, Elsevier, pp 875
- Solano-Gallego L, Baneth G (2011) "Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra" **Veterinary Parasitology** 181, 48-60
- Solano-Gallego L, Sainz A, Rouca X, Estrada-Peña A, Miró G (2016) "A review of canine babesiosis: the European perspective" **Parasites & Vectors** 9, 336
- Solano-Gallego L, Trotta M, Carli E, Carcy B, Caldin M, Furlanello T (2008) "*Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease" **Veterinary Parasitology** 157, 211-221
- Stockham SL, Scott MA (2008) **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology** 2° Ed, Wiley-Blackwell, pp 920
- Valenciano AC, Cowell RL, Rizzi TE, Tyler RD (2014) **Atlas of canine and feline peripheral blood smears** 1° Ed, Elsevier, pp 281
- Vap LM, Harr KE, Arnold JE, Freeman KP, Getzy K, Lester S, Friedrichs KR (2012) "ASVCP quality assurance guidelines: control of preanalytical and analytical factors of hematology for mammalian and nonmammalian species, hemostasis, and crossmatching in veterinary laboratories" **Veterinary Clinical Pathology** 41, 8-17
- Villiers E (2007) "Introduction to haematology" in Villiers E, Blackwood L (Ed.) **BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology** 2° Ed, BSAVA, 23-32
- Weiss DJ, Tvedten H (2012) "The complete Blood Count, Bone Marrow Examination, and Blood Banking" in Willard MD, Tvedten H (Ed.) **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods** 5° Ed, Elsevier, 12-37
- Yu C, Falk RT, Kimlin MG, Rajaraman P, Sigurdson AJ, Horst RL, Cosentino LM, Linet MS, Freedman DM (2010) "The impact of delayed blood centrifuging, choice of collection tube, and type of assay on 25-hydroxyvitamin D concentrations" **Cancer Causes & Control** 21, 643-648

ANEXO I – Atividades Desenvolvidas Durante o Estágio Curricular

O estágio curricular desenvolvido durante o 6º Ano do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi realizado no Segalab - Laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar e nos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS, no Laboratório de Histologia e Embriologia.

O estágio no Segalab foi realizado entre o dia 2 de janeiro e 2 de abril, sob a orientação da Dra. Vanessa Silva. Durante estes três meses acompanhei todo o trabalho realizado no laboratório de análises clínicas, desde a chegada das amostras até à emissão do diagnóstico e ao envio/comunicação dos resultados. Assim, foi possível adquirir competências na execução de técnicas laboratoriais, incluindo o uso correto do equipamento laboratorial, como as máquinas de hematologia, de bioquímica e de endocrinologia. Destas, tive um maior contacto com o aparelho de hematologia, Advia 120, sendo que para além de aprender a funcionar como referido aparelho, aprendi também a interpretar as informações geradas pelo aparelho. No total acompanhei a realização de 1644 hemogramas durante o período do estágio. Para além disso, aprendi e pratiquei a realização de esfregaços sanguíneos, bem como a coloração de Wright. Dos esfregaços sanguíneos observados (n=302), diagnostiquei várias alterações morfológicas e quantitativas, como sejam: 1) alterações em plaquetas: trombocitopenias, presença de agregados plaquetários e macroplaquetas; 2) alterações em leucócitos: alterações tóxicas nos neutrófilos (corpos de Dohle), neutrófilos hipersegmentados e em banda, presença de basófilos, linfócitos reativos e imaturos; 3) alterações em eritrócitos: sinais regenerativos da linhagem eritróide, como policromasia, anisocitose e presença de eritrócitos nucleados, anemias hemolítica imuno-mediadas, caracterizadas pela presença de esferócitos e de aglutinação, anemias microcíticas e hipocrómicas por deficiência em ferro, alterações morfológicas (esquizócitos, queratócitos, acantócitos, equinócitos, leptócitos e codócitos); 4) presença de hemoparasitas como *Babesia* e microfilárias. Foram ainda consultadas lâminas de arquivo para observação doutros agentes (*Hepatozoon*). Os esfregaços sanguíneos e os hemogramas realizados foram, principalmente, de cães e gatos, porém, também houve casos de equinos, bovinos, pequenos ruminantes, aves e répteis. Para além disso, tive a oportunidade de treinar a realização de esfregaços de *buffy-coat*.

No decorrer destes três meses acompanhei e realizei urianálises, que incluíam a avaliação da tira e da densidade, observação ao microscópio de urina a fresco e de esfregaço após coloração de rotina. De entre os achados observados, destacaram-se: presença de eritrócitos, leucócitos, cilindros, células e cristais (estruvite, oxalato de cálcio, bilirrubina, amorfos e de cistina). Nestes três meses foram realizados urianálises (n=189), sendo que algumas apenas incluíam a tira

urinária, outras apenas a avaliação microscópica da urina a fresco e outras incluíam o exame completo à urina. Para além das urianálises, acompanhei também as coprologias, sendo que foram efetuadas 51 coprologias entre janeiro e março de 2017. As análises coprológicas realizadas incluíram a avaliação coprológica por sedimentação, contagem de ovos através do método de McMaster e o método de Baermann para pesquisa de parasitas pulmonares. As 51 amostras avaliadas pertenciam a equinos, bovinos, pequenos ruminantes, canídeos, felídeos e aves. O diagnóstico mais comum foi a presença de ovos de *Eimeria*, no entanto também foram encontrados ovos de *Fasciola hepática* e de estrôngilos. Por fim, tive ainda a oportunidade de acompanhar e de realizar testes serológicos e proteinogramas.

O estágio nos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS, no Laboratório de Histologia e Embriologia foi realizado entre o dia 3 de abril e 28 de maio, sob a orientação da Professora Dra. Marta Santos e do Professor Dr. Ricardo Marcos. Durante estes dois meses acompanhei a casuística das amostras enviadas do Hospital Veterinário da Universidade do Porto (UPVet) e observei casos do arquivo citológico. Numa primeira fase procedi ao registo e processamento das amostras/esfregaços, incluindo coloração com Diff-Quik® e montagem das lâminas. Nas amostras líquidas, foi possível acompanhar a realização da técnica de *cytospin*, de modo a concentrar as células presentes numa pequena área de monocamada. Observei e descrevi os esfregaços dos casos de rotina, procurando com a ajuda dos livros de referência da área chegar ao diagnóstico. Posteriormente, os casos foram observados com um dos orientadores num microscópio de dupla cabeça e a descrição/diagnósticos discutidos. A casuística durante este período de estágio pode ser observada na tabela 5 e os casos observados de rotina e de arquivo estão na tabela 6 e 7, respetivamente.

Foi durante o período de estágio no Laboratório de Histologia e Embriologia do ICBAS que procedi à avaliação dos esfregaços sanguíneos e de *buffy-coat* efetuados no Segalab para pesquisa de hemoparasitas e usados no presente trabalho.

Amostra	Número
Sangue	44
Cutânea	34
Gânglio linfático	8
Baço	7
Urina	7
Fígado	4
Glândula mamária	2
Lavagem uterina em éguas	2
Intestino	1
Osso	1
Testículo	1
Músculo	1
Gengiva	1
Timo	1
Pulmão	1
Medula óssea	1
Vagina	1
Espinhal medula	1
Ouvido	1
Secreção pulmonar	1
Excreção nasal	1
Líquido pleural	1
Efusão pericárdica	1
Total	123

Tabela 5: Casuística nos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS, no Laboratório de Histologia e Embriologia entre o dia 3 de abril e 28 de maio.

Diagnóstico	Número
Inconclusivo	23
Lipoma	8
Linfoma	3
Quisto epidérmico/folicular	3
Mastocitoma	2
Inflamação	6
Neoplasia do folículo piloso	2
Gânglio linfático reativo	2
Hiperplasia reativa da polpa branca do baço	1
Neoplasia das bainhas perivasculares (Hemangiopericitoma)	1
Hematoma	1
Carcinoma dos sacos anais	1
Timoma	1
Adenocarcinoma pulmonar	1
Leiomioma vaginal	1
Meningioma	1
Otite	1
Tumor das glândulas perianais	1
Total	59

Tabela 6: Diagnóstico dos casos de rotina recebidos nos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS, no Laboratório de Histologia e Embriologia entre o dia 3 de abril e 28 de maio.

Diagnóstico	Número
Inflamação	17
Quisto epidérmico/folicular	5
Tumor das glândulas perianais	4
Neoplasia das bainhas perivasculares (Hemangiopericitoma)	4
Hematoma	3
Neoplasia do folículo piloso	3
Adenoma sebáceo	3
Carcinoma de células escamosas	3
Histiocitoma	3
Mastocitoma	3
Osteossarcoma	3
Melanoma	2
Melanoma amelanótico	2
Lipoma	2
Fibrossarcoma	2
Carcinoma pulmonar	1
Carcinoma da tireoide	1
Condrossarcoma	1
Hemangiossarcoma	1
Seminoma	1
Linfoma renal	1
Shawnoma maligno	1
Tumor ovárico misto das células da granulosa e digerminoma	1
Total	67

Tabela 7: Diagnóstico dos casos de arquivo observados entre o dia 3 de abril e 28 de maio nos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS, no Laboratório de Histologia e Embriologia.

ANEXO II - Caracterização da Amostra em Estudo

A pesquisa de hemoparasitas foi realizada numa amostra de 100 animais, 23 gatos e 77 cães. A idade destes animais variou desde os 6 meses aos 15 anos. Dos animais amostrados 60 eram machos e 40 eram fêmeas. As amostras foram recolhidas em Portugal continental, sendo que no gráfico 2 pode-se observar a distribuição das amostras por distrito.

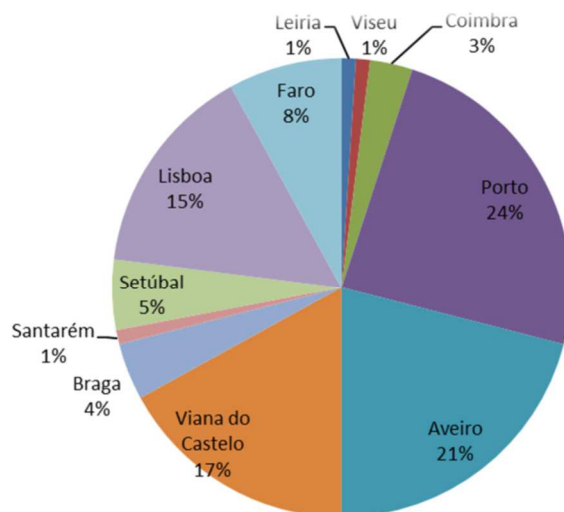


Gráfico 2: Distribuição das amostras pelos distritos de Portugal continental.

Das 100 amostras recolhidas para pesquisa de hemoparasitas, 14 foram positivas para *Babesia* e 4 para *Dirofilaria*. A caracterização das amostras pode ser observada na tabela 8 e 9 relativamente aos animais positivos à *Dirofilaria* e à *Babesia*, respetivamente.

Número	Posição	Espécie	Sexo	Idade	Raça	Distrito
1	8754-G2	Canídeo	Fêmea	7 Anos	Labrador	Aveiro
2	8763-D10	Canídeo	Macho	?	SRD	Faro
3	8776-F6	Canídeo	Fêmea	14 Anos	SRD	Viana do Castelo
4	8718-B6	Canídeo	Macho	15 Anos	SRD	Coimbra

Tabela 8: Caracterização dos animais onde foi possível a identificação de microfilárias no esfregaço sanguíneo e no esfregaço de *buffy-coat*. SRD – Sem Raça Determinada

Número	Posição	Espécie	Sexo	Idade	Raça	Distrito
5	8782-G6	Canídeo	Macho	2 Anos	SRD	Viana do Castelo
6	8732-G5	Canídeo	Macho	14 Anos	Epagneul Breton	Porto
7	8754-H10	Canídeo	Macho	4 Anos	SRD	Viana do Castelo
8	8769-G8	Canídeo	Macho	9 Anos	Golden Retriever	Braga
9	8764-E7	Canídeo	Fêmea	?	Cocker	Viana do Castelo
10	8765-C10	Canídeo	Macho	?	SRD	Aveiro
11	8770-A2	Canídeo	Macho	5 Anos	SRD	Viana do Castelo
12	8771-F10	Canídeo	Macho	5 Anos	Rafeiro Alentejano	Viana do Castelo
13	8777-B5	Canídeo	Macho	12 Anos	SRD	Aveiro
14	8783-F12	Canídeo	Macho	8 Anos	Labrador	Viana do Castelo
15	8783-B9	Canídeo	Fêmea	5 Anos	Boxer	Aveiro
16	8782-G9	Canídeo	Macho	4 Anos	Pastor Alemão	Viana do Castelo
17	8707-G1	Canídeo	Fêmea	12 Anos	SRD	Aveiro
18	8718-H4	Canídeo	Fêmea	9 Anos	Boxer	Porto

Tabela 9: Caracterização dos animais onde foi possível a identificação de organismos de *Babesia* spp. no esfregaço sanguíneo e no esfregaço de *buffy-coat*. SRD – Sem Raça Determinada

Relativamente aos animais com dirofilariose, não se verificou uma relação entre a presença do parasita e o sexo, raça ou distrito. Porém, a amostragem de animais positivos é baixa, o que não nos permite retirar conclusões fidedignas. Segundo a bibliografia, há uma maior probabilidade que cães de exterior e de raças grandes fiquem infetados. Para além disso, também tem sido reportado uma maior prevalência em cães machos, o que não se refletiu neste estudo, onde a prevalência foi igual em ambos os sexos (Adanir *et al.* 2013; Meireles *et al.* 2014). Por fim, a prevalência é maior em cães adultos, por estarem expostos durante um maior período de tempo. Os animais com dirofilariose deste estudo apresentaram uma idade superior ou igual a 7 anos, exceto um caso em que não se conhecia a idade, o que parece refletir essa tendência.

Dos 14 animais com babesiose, 7 eram de Viana do Castelo, 4 de Aveiro, 2 do Porto e 1 de Braga. Todos os animais positivos vivem do norte e centro do país, no entanto, a maioria da amostragem total de animais pertencia a estas regiões. De facto, segundo a bibliografia seria de esperar uma maior prevalência no norte do país, sendo esta região considerada endémica (Cardoso *et al.* 2008). Dentro da região do Norte podemos observar uma predominância dos casos positivos em Viana do Castelo. Aliás, dos 17 animais amostrados desta região, 7 tinham *Babesia*, que corresponde a uma prevalência de 41,2%. Também em Aveiro houve um número considerado de animais positivos, sendo que 4 dos 21 animais amostrados tinham babesiose, o que corresponde a uma prevalência de 19%.

Os cães com babesiose tinham entre 2 e 14 anos, parecendo haver um maior predomínio em cães adultos e idosos. Segundo a bibliografia, há uma maior prevalência em animais jovens e

adultos (Solano-Gallego *et al.* 2016). Para além disso, podemos observar uma predominância de cães machos em relação às fêmeas com babesiose. No entanto, a amostra total estudada também apresenta um predomínio de animais do sexo masculino. Segundo a bibliografia, tem sido reportado uma menor prevalência em fêmeas inteiras quando comparadas com fêmeas castradas e machos inteiros e castrados (Solano-Gallego *et al.* 2016). Porém, noutros estudos não foi encontrado nenhuma relação entre o sexo e a idade do animal e a presença de infeção (Kirtz *et al.* 2012). Relativamente à raça, tem sido reportado uma maior prevalência em raças de caça (Solano-Gallego *et al.* 2008). Porém, neste estudo não pareceu haver uma relação entre a raça e a infeção por *Babesia*.

Quanto aos sinais clínicos que os animais apresentavam no momento da recolha do sangue, apenas para 2 casos de babesiose essa informação foi fornecida ao laboratório. Em ambos, o animal mostrava-se prostrado e com alterações na cor da urina, havendo suspeita de hematuria. Para além disso, um destes ainda apresentava mucosas pálidas e anorexia. Segundo a bibliografia, os sinais clínicos em animais com babesiose podem ser inespecíficos, como letargia, fraqueza, vômitos, anorexia e febre, ou mais específicos, como mucosas pálidas, icterícia, esplenomegalia, e alterações na cor da urina, que deverão levar à suspeita de um processo hemolítico (Irwin 2010). Assim, podemos ver que a sintomatologia apresentada por estes dois cães se enquadra nos sinais clínicos comuns em animais com babesiose.

Todos os animais amostrados foram sujeitos a análises hematológicas. As alterações encontradas nos hemogramas dos animais com *Dirofilaria* e com *Babesia* estão nas tabelas 10 e 11, respetivamente.

Número	Hemoparasita	Hematócrito	Número de plaquetas	Número de leucócitos
1	<i>Dirofilária immitis</i>	33,90%	209 x 10 ³ /μl	10,37 x 10 ³ /μl
2	<i>Dirofilária immitis</i>	38,40%	384 x 10 ³ /μl	7,66 x 10 ³ /μl
3	<i>Dirofilária immitis</i>	47,80%	204 x 10 ³ /μl	7,81 x 10 ³ /μl
4	<i>Dirofilária immitis</i>	50,60%	322 x 10 ³ /μl	15,45 x 10 ³ /μl

Tabela 10: Valores do hematócrito, do número de plaquetas e de leucócitos nos animais com dirofilariose. Os valores inferiores aos valores de referência estão a vermelho. Valores de referência para o hematócrito: 37%-55%. Valores de referência para o número de plaquetas: 200 x 10³/μl – 500 x 10³/μl. Valores de referência para o número de leucócitos: 6,0 x 10³/μl – 17,0 x 10³/μl.

Nos animais com dirofilariose, as alterações no hemograma são inespecíficas e nem sempre estão presentes. Apesar de se poder observar anemias ligeiras a moderadas e trombocitopenias ligeiras (Oliveira *et al.* 2013), neste estudo apenas 1 animal tinha anemia ligeira. Para além disso,

nesse caso havia a presença de basófilos no esfregaço sanguíneo, que podem estar aumentados em infecções por *Dirofilaria* (Oliveira *et al.* 2013).

Número	Hemoparasita	Hematócrito	Número de plaquetas	Número de leucócitos
5	<i>Babesia</i> spp.	29,70%	16 x 10 ³ /μl	4 x 10 ³ /μl
6	<i>Babesia</i> spp.	39,00%	47 x 10 ³ /μl	4,66 x 10 ³ /μl
7	<i>Babesia</i> spp.	30,70%	27 x 10 ³ /μl	5,6 x 10 ³ /μl
8	<i>Babesia</i> spp.	54,90%	209 x 10 ³ /μl	12,48 x 10 ³ /μl
9	<i>Babesia</i> spp.	36,00%	32 x 10 ³ /μl	2,67 x 10 ³ /μl
10	<i>Babesia</i> spp.	40,10%	34 x 10 ³ /μl	8,08 x 10 ³ /μl
11	<i>Babesia</i> spp.	35,00%	108 x 10 ³ /μl	5,58 x 10 ³ /μl
12	<i>Babesia</i> spp.	36,50%	58 x 10 ³ /μl	6,94 x 10 ³ /μl
13	<i>Babesia</i> spp.	13,60%	90 x 10 ³ /μl	15,98 x 10 ³ /μl
14	<i>Babesia</i> spp.	35,40%	19 x 10 ³ /μl	4,59 x 10 ³ /μl
15	<i>Babesia</i> spp.	26,60%	24 x 10 ³ /μl	3,49 x 10 ³ /μl
16	<i>Babesia</i> spp.	38,80%	41 x 10 ³ /μl	7,26 x 10 ³ /μl
17	<i>Babesia</i> spp.	39,10%	33 x 10 ³ /μl	3,39 x 10 ³ /μl
18	<i>Babesia</i> spp.	35,80%	135 x 10 ³ /μl	7,87 x 10 ³ /μl

Tabela 11: Valores do hematócrito, do número de plaquetas e de leucócitos nos animais com babesiose. Os valores inferiores aos valores de referência estão a vermelho. Valores de referência para o hematócrito: 37%-55%. Valores de referência para o número de plaquetas: 200 x 10³/μl – 500 x 10³/μl. Valores de referência para o número de leucócitos: 6,0 x 10³/μl – 17,0 x 10³/μl.

Relativamente aos animais com babesiose, a alteração do hemograma mais comum foi a presença de trombocitopenia. Aliás, dos 14 animais positivos, apenas 1 não apresentava esta alteração. Este caso foi o que apresentou um menor grau de parasitemia. De facto, segundo a bibliografia a presença de uma trombocitopenia moderada a severa é extremamente comum em animais com *Babesia* (Irwin 2010). Outra alteração encontrada foi a presença de anemia, ocorrendo em 64% dos casos. Esta prevalência é semelhante à registada por Kirtz *et al.*. Para além disso, a anemia costuma ser ligeira a moderada (Kirtz *et al.* 2012). Neste estudo, 6 dos 9 casos com anemia apresentaram-se com uma anemia ligeira, 2 com moderada e 1 com severa. O parasita encontrado neste estudo foram formas de *Babesia* grande, sendo que a probabilidade é elevada que seja *B. canis*, devido à sua maior prevalência em Portugal. Segundo alguns estudos, a anemia provocada pela *B. canis*, parece ser não regenerativa (Solano-Galleno & Baneth 2011; Kirtz *et al.* 2012). De facto, dentro dos 9 casos de anemias, 3 apresentavam sinais de regeneração e 6 não (67%). Por fim, também se avaliou as alterações dos números de leucócitos, em que 8 dos 14 casos apresentou uma leucocitopenia. De acordo com Kirtz *et al.* esta é a alteração mais comum encontrada nos leucócitos.